



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Menalda Valeriano André

Controlo da Qualidade em Microbiologia Alimentar – Estágio em
laboratório com acreditação IPAC segundo a NP EN ISO/IEC
17025

Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Paulo Fernandes

e, coorientação da
Eng^a Carla Ramos

julho de 2017

Índice geral

Índice de tabelas	iv
Índice de figuras	vi
Índice de gráficos	vii
AGRADECIMENTOS	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	xi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. O controlo da qualidade microbiológica e a legislação em matéria de higiene e segurança alimentar.....	2
1.3. A acreditação de ensaios segundo a NP EN ISO IEC 17025	4
CAPÍTULO 2 – A UNIDADE DE MICROBIOLOGIA APLICADA	6
CAPÍTULO 3 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO	9
3.1. Conhecimento do laboratório, suas práticas de trabalho e medidas preventivas de contaminação	10
3.2. Trabalho técnico	11
3.2.1. Descontaminação e esterilização.....	11
3.2.1.1. Higiene e limpeza do laboratório	11
3.2.1.2. Manuseamento e gestão de resíduos.....	12
3.2.1.3. Ruturas e derrames envolvendo materiais perigosos.....	13

3.2.1.4. Esterilização e desinfecção de material	14
3.2.2. Controlo diário dos equipamentos.....	15
3.2.3. Preparação de meios de cultura	15
3.2.3.1. Conservação dos meios de cultura, diluentes e/soluções	16
3.2.3.2. Controlo da qualidade de meios de cultura	16
3.2.4. Realização de análises	16
3.2.5. Controlo da qualidade.....	17
3.2.5.1. Brancos.....	18
3.2.5.2. Ensaio em paralelo e sementeira em duplicado.....	18
3.2.5.3. Contagens em duplicado.....	19
3.2.5.4. Controlo com material de referência	19
3.2.5.5. Controlo dos meios de cultura.....	19
3.2.5.6. Controlo de esterilidade	20
3.2.5.7. Cartas de produtividade	20
3.2.5.8. Amostras cegas	21
3.2.5.9. Ensaio interlaboratoriais (EIL)	21
3.2.6. Manutenção de culturas de referência.....	21
3.2.7. Auditorias.....	22
3.3. Qualificação como operadora	23
3.4. Implementação de novos métodos	25
3.4.1. Implementação do método de contagem de <i>E. coli</i> e contagem de <i>Clostridium perfringens</i> em águas.....	28

3.4.1.1. Implementação do método de Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> em águas.....	29
3.4.1.2. Implementação do método de <i>E. coli</i> e coliformes em águas...	32
3.4.1.3. Cálculo das incertezas.....	34
3.4.1.4. Avaliação de desempenho nos ensaios interlaboratoriais	36
3.5. Participação em atividades de desenvolvimento do laboratório	37
3.5.1. Objetivos do trabalho	38
3.5.2. Análises microbiológicas realizadas.....	38
3.5.3. Métodos	39
3.5.4.1. Contagem de microrganismos a 30°C	40
3.5.4.2. Contagem de microrganismos a 6.5°C	41
3.5.4.3. Contagem de Enterobacteriaceae	41
3.5.4.4. Contagem de <i>Escherichia coli</i>	42
3.5.4.5. Contagem de Estafilococos coagulase positiva.....	42
3.5.4.6. Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
3.5.4.7. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	43
3.5.4.8. Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores	43
3.5.4.9. Pesquisa e identificação de <i>Vibrio</i> spp.....	44
3.5.4.10. Pesquisa e identificação de bactérias halófilas	45
3.5.4. Tratamento de dados	46
3.5.5. Resultados e discussão.....	47
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	55
Referências bibliográficas	57

Índice de tabelas

Tabela 1: Relação entre grupo de risco com o nível de segurança, os riscos, as práticas e os equipamentos.....	10
Tabela 2: Avaliação de desempenho	24
Tabela 3: Fontes de incerteza - Contagem de coliformes e E.coli	27
Tabela 4: Forma de apresentação dos resultados da contagem.....	30
Tabela 5: Resultados da contagem de Clostridium perfringens	30
Tabela 6: Performance do método	30
Tabela 7: Análise de variância (ANOVA)	31
Tabela 8: Resultados da contagem de coliformes.....	33
Tabela 9: Performance do método	33
Tabela 10: Resultados da contagem de E.coli	33
Tabela 11: Performance do método	34
Tabela 12: Cálculo de incerteza - Clostridium perfringens	35
Tabela 13: Cálculo de incerteza – coliformes.....	35
Tabela 14: Cálculo de incerteza - E.coli	36
Tabela 15: Avaliação de desempenho do laboratório nos EIL – Clostridium perfringens	36
Tabela 16: Avaliação de desempenho nos EIL – coliformes e E.coli	37
Tabela 17: Análises microbiológicas realizadas	38
Tabela 18: Correspondência entre os meios de cultura e os microrganismos de referência usados.....	39

Tabela 19: Testes necessários para a identificação de bactérias halófilas e resultados esperados	45
Tabela 20: Valores médios da Contagem de Enterobacteriaceae	50
Tabela 21: Valor estimado da análise dos esfregaços	53

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura orgânica da UMA 6

Figura 2: Valores médios das Contagens de Microrganismos a 30 e 6,5°C 49

Índice de gráficos

Gráfico 1: Valores percentuais da pesquisa de bactérias halófilas, esporos de clostrídios sulfito-redutores e <i>Vibrio</i> spp.....	51
--	----

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força para seguir cada vez mais adiante e pelo conforto nos momentos difíceis da minha caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Doutor Paulo Fernandes a quem sou muito grata, pela confiança, pelos ensinamentos e esclarecimentos para que este trabalho se tornasse realidade.

À Engenheira Carla Ramos pela paciência, disponibilidade, apoio, pela incansável orientação e por todo ensinamento transmitido na realização do estágio e deste trabalho.

Ao Victor Monteiro pelo imenso apoio nas análises laboratoriais, por todo ensinamento transmitido, pela paciência e disponibilidade total no esclarecimento de dúvidas.

À Luísa Imperadeiro por toda colaboração laboratorial, pela disponibilidade, pelos conhecimentos partilhados e por toda experiência transmitida na recolha de amostras.

Agradeço também, ao Dr. Emanuel por todo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Valeriano & Adélia, e aos meus irmãos Edvaldo, António e Octávio, pelas palavras de apoio e por mostrarem o melhor caminho a seguir.

A todos meus familiares, em especial aos tios Octávio, Vitoria, Tonito e Carla pelas palavras de incentivo e por nunca medirem esforços para me ajudar.

A todos amigos e colegas, em especial a Fábria, Diana, Ana Rita, Luciana, Nonoca, Dorinha e Cláudia pelo apoio e amizade em todos momentos.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para que este trabalho fosse realidade, **KANIMAMBO!**

RESUMO

A segurança alimentar, representa uma das principais preocupações com que as autoridades, os agentes económicos e os consumidores se confrontam atualmente. O controlo da qualidade microbiológica é, não apenas, uma obrigatoriedade legal, mas também uma prática comum e necessária no âmbito do correto funcionamento dos sistemas de gestão da segurança alimentar implementados pelas empresas dedicadas à área alimentar. O presente relatório faz uma abordagem ao controlo da qualidade alimentar na sua vertente microbiológica e à importância do reconhecimento da competência técnica para a realização de procedimentos analíticos através da Acreditação, descrevendo as principais atividades desenvolvidas durante o estágio realizado na Unidade de Microbiologia Aplicada, laboratório com Acreditação IPAC no âmbito da norma NP EN ISO 17025. O estágio permitiu o desenvolvimento de um conjunto de atividades que permitiram a qualificação técnica da estagiária com vista à realização de trabalhos autónomos em laboratório de microbiologia, bem como o desenvolvimento de competências específicas em matéria de controlo da qualidade e implementação de normas e métodos na área da microbiologia alimentar, em particular na análise de águas de consumo humano, géneros alimentícios e esfregaços de superfícies. As atividades realizadas no âmbito de um trabalho de colaboração com uma empresa da área alimentar, sobre a qualidade microbiológica da água de demolha e do bacalhau demolhado são também apresentadas.

ABSTRACT

Food safety represents one of the main concerns that authorities, economic operators and consumers, face today. The control of microbiological quality is not only a legal obligation, but also a common practice and it is required for the correct functioning of the safety management systems implemented by the companies dedicated to the food area. The present report makes an approach to the microbiological control of food and the importance of laboratory accreditation for the recognition of competence to carry out specific tests, describing the main activities developed during the internship on the Applied Microbiology Unit, a laboratory with Accreditation from IPAC according to the standard NP EN ISO 17025. The internship has enabled the development of a set of activities that allowed the technical qualification to perform autonomous work in a laboratory of Microbiology, as well as the development of specific skills in the field of quality control and implementation of standards and methods in the area of food microbiology, in particular for the analysis of drinking waters, food and swabs of surfaces. The activities carried out within the framework of a collaboration with a food company, on the microbiological quality of the water from soaking and desalted cod are also presented.

july 2017

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ALOA – Agar de Listeria seg. Ottaviani e Agosti

APT – Água Peptonada Tamponada

ASPW – Alkaline Saline Peptona Water

ATCC – American Type Culture Collection

BPA – Baird-Parker agar

CBPL – Código de Boas Práticas Laboratoriais

CCA – Agar Cromogénico para Coliformes

CE – Comissão Europeia

CQ – Controlo da Qualidade

CSB – Câmara de Segurança Biológica

EIL – Ensaio Interlaboratoriais

EN – Norma Europeia

ERSAR – Entidade Reguladora do Serviços de Águas e Resíduos

ESTG – Escola Superior de Tecnologia e Gestão

EPI – Equipamento de Proteção Individual

EQA - External Quality Assessment

HA – Halophilic Agar

HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Point

HB – Halophilic Broth

HPA - Health Protection Agency

IEC - International Electrotecnic Comission

IPAC – Instituto Português de Acreditação

IPQ – Instituto Português da Qualidade

IPVC – Instituto Politécnico de Viana do Castelo

IRAR – Instituto Regulador de Águas e Resíduos

ISO – International Organization for Standardization

LDB – meio da descarboxilação da L- Lisina

MR - Material de Referência

MLSA – Membrane Lauryl Sulphate Agar

MKTTn – meio de Muller-Kaufman Tetratonato e novobiocina

MRVP – meio Methyl Red e Voges-Proskaner

NaCl – Cloreto de sódio

NMA – Motility Nitrate Medium base

NCTC – National Collection of Type Cultures

NP – Norma Portuguesa

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Plate Count Agar

pH – Potencial Hidrogeniónico

RPF – Suplemento Rabbit Plasma Fibrinogen

RVS – meio de Rappaport-Vassiliadis de Soja

SCA – Simmons Citrate Agar

SMID2 – Gelose ChromiD Salmonella

TB – Tryptophan Broth

TBX – meio gelosado com sais biliares e substrato cromogénico

TSCE – Agar de Triptona Sulfito e Cisteína

TSI – agar de ferro glucose, lactose e sacarose

UE – União Europeia

UMA – Unidade de Microbiologia Aplicada

ufc/g – Unidade formadora de colónias por grama

ufc/ml – Unidade formadora de colónias por mililitro

ufc/cm² – Unidade formadora de colónias por centímetro quadrado

UA – Ureia Agar

VRBG – Violet Red Bile Glucose agar

XLD – Agar de Xilose Lisina e Desoxilato

WDCM – World Data Centre for Microorganisms

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

A qualidade e segurança alimentar tem sido objeto de uma constante evolução, com vista à oferta de produtos seguros ao consumidor. De entre os vários parâmetros com influência na inocuidade dos alimentos, as suas características microbiológicas assumem particular relevância, quer pelas doenças que podem provocar quer pela estabilidade do alimento com manutenção das suas qualidades. A análise microbiológica de alimentos é assim uma importante vertente a ter em consideração em qualquer sistema que tenha como intenção a garantia da higiene e segurança alimentar. Para Gava *et al* (2008), a segurança dos alimentos, tem por objetivo, a proteção e a preservação da saúde humana, dos riscos representados por perigos possíveis de estarem representados nos alimentos.

O controlo e segurança da qualidade dos alimentos tem sido um dos grandes desafios colocados à indústria alimentar, quer por parte da legislação existente, quer por parte dos consumidores, cada vez mais informados e exigentes (Fraqueza, 2002).

Para minimizar o acesso de microrganismos aos alimentos, a qualidade microbiológica do ambiente ao qual um alimento é exposto (superfícies de contacto com alimentos) e os ingredientes que são adicionados ao alimento devem ser de boa qualidade microbiológica (Ray, 1996).

Segundo Lacasse (1995), a análise microbiológica dos alimentos, permite controlar a qualidade microbiológica geral dos géneros alimentícios, e detetar a presença de microrganismos patogénicos ou de toxinas suscetíveis de causarem toxinfecções alimentares.

As análises microbiológicas dos alimentos são ainda indispensáveis para a deteção do microrganismo que com forte probabilidade foi causador de uma toxinfecção alimentar. Além disso, pode dar importantes indicações sobre as condições de higiene em que o alimento foi preparado. A análise microbiológica

dos produtos finais, permite a constituição do seu historial e evita a comercialização de produtos não conformes. No entanto, esta análise, não sendo preventiva, não permite assegurar a qualidade microbiológica dos produtos fabricados (Fraqueza, 2002), pelo que no âmbito da promoção da segurança alimentar esta abordagem é sobretudo importante na implementação, verificação e monitorização dos sistemas de gestão de segurança alimentar.

Cabe às entidades responsáveis e os consumidores uma exigência cada vez maior da avaliação da qualidade dos produtos produzidos, de forma a assegurar a qualidade microbiológica dos mesmos. E, nesta linha de pensamento, é também cada vez mais uma exigência, quer dessas entidades, quer também dos produtores, a uniformização de métodos e critérios para avaliação dessa qualidade.

1.2. O controlo da qualidade microbiológica e a legislação em matéria de higiene e segurança alimentar

A qualidade microbiológica dos produtos alimentares baseia-se no cumprimento das regras de higiene e boas práticas na manipulação de alimentos, com vista a garantir a saúde pública. A relevância do cumprimento destas questões é comprovada pela existência de legislação que dita as regras e ou obrigações para todos os que desenvolvem atividades ligadas ao sector alimentar.

A entrada em vigor, desde 2006, de todo um pacote legislativo relativo à higiene e segurança alimentar, obriga à implementação de sistemas de gestão da segurança alimentar onde o controlo da qualidade microbiológica e o cumprimento de critérios microbiológicos são uma importante vertente. A legislação nacional aplicável a higiene e segurança alimentar, conta com inúmeros regulamentos, diplomas e ou decretos-lei para o sector, fazendo distinções quanto ao tipo de produto e ou atividade. De toda a legislação existente, existem alguns diplomas realmente estruturantes para a segurança alimentar como por exemplo o Regulamento 178/2002, o Regulamento 852/2004, o Regulamento 853/2004 e o Regulamento 2073/2005.

O Regulamento CE nº 178/2002 do parlamento Europeu e do conselho de 28 de janeiro de 2002, estabelece os procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios com vista a garantir um elevado nível de proteção da saúde humana e dos interesses dos consumidores em relação aos géneros alimentícios. Este regulamento, estabelece também princípios e responsabilidades comuns, a maneira de assegurar uma sólida base científica e disposições e procedimentos organizacionais eficientes para servir de base à tomada de decisões em questões de segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais.

O regulamento CE nº 852/2004, estabelece as regras gerais destinadas aos operadores de empresas do sector alimentar no que se refere à higiene de géneros alimentícios. Este regulamento aplica-se em todas as fases da produção, transformação e distribuição de alimentos, tendo em particular consideração os princípios relacionados com a responsabilização dos operadores do sector alimentar quanto a segurança dos géneros alimentícios e a aplicação dos procedimentos baseados nos princípios HACCP.

A implementação do regulamento CE nº 853/2004, estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. As regras apresentadas neste regulamento complementam as descritas no regulamento CE nº 852/2004 e são aplicáveis aos produtos de origem animal transformados e não transformados.

Quanto ao regulamento CE nº 2073/2005, este prevê a realização de controlos microbiológicos aos géneros alimentícios e as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do sector alimentar quando aplicarem as medidas de higiene gerais e específicas referidas no regulamento 852/2004. De acordo com este regulamento, a autoridade competente deve verificar o cumprimento das regras e critérios estabelecidos no presente regulamento em conformidade com o regulamento 882/2004 no contexto de uma análise de riscos a fim de detetar e quantificar microrganismos, suas toxinas ou metabolitos, quer no quadro de verificação dos processos, quer em relação a géneros alimentícios suspeitos de serem perigosos.

1.3. A acreditação de ensaios segundo a NP EN ISO IEC 17025

De acordo com Lightfoot & Maier (1998), todos os laboratórios que realizam ensaios microbiológicos em apoio ao cumprimento da regulamentação deveriam ser acreditados pelo organismo de acreditação apropriado. A implementação de um programa de garantia da qualidade dará confiança na validade dos resultados produzidos.

A acreditação é o procedimento pelo qual um organismo autorizado reconhece formalmente que uma entidade é competente para realizar determinadas atividades específicas, evidenciando-o através de um certificado que descreve o âmbito da acreditação. Este procedimento é também uma forma de estabelecer uma rede de reconhecimento de competências, no sentido em que um amplo conjunto de clientes reconhece a competência do organismo avaliador e por sua vez este reconhece a competência dos laboratórios (Almeida e Pires, 2006).

Em Portugal, o organismo responsável pela acreditação é o Instituto Português de Acreditação (IPAC). No processo de acreditação, o IPAC é responsável pela avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade. Esta atividade, está sujeita à legislação comunitária que obriga um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação.

Para Almeida e Pires (2006), a acreditação surge como o mecanismo avaliador que só deve ser acionado quando o sistema da qualidade estiver implementado e a funcionar sem grande resistência. O processo de acreditação é de extrema importância para o laboratório, pois este serve para ganhar e transmitir confiança na execução de atividades técnicas, ao confirmar a existência de um nível de competência técnico reconhecido internacionalmente.

A norma NP EN ISO/IEC 17025, abrange os ensaios e as calibrações realizadas segundo métodos normalizados, métodos não normalizados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório. Esta norma, é aplicável a todos os laboratórios que efetuarem ensaios e /ou calibrações, independentemente do número de pessoas ou da extensão do âmbito das suas atividades e ainda

laboratórios nos quais os ensaios e/ou calibrações façam parte integrante da inspeção e da certificação de produtos.

A acreditação é voluntária, contudo, alguns decretos-lei indicam a acreditação como condição necessária para o exercício da atividade, o que de certa forma se traduz na obrigatoriedade dos laboratórios possuírem ensaios acreditados de forma a trabalhar conforme a legislação. Existe já alguma legislação relativa ao controlo microbiológico que obriga as entidades que o realizam a terem os seus métodos acreditados. Por exemplo, segundo o ponto nº 8 do artigo 37º do decreto-lei 306/2007, as determinações analíticas em termos do controlo da qualidade da água deverão ser realizadas por laboratórios de análises acreditados para o efeito. Esta obrigatoriedade é também referida no artigo 2º da portaria nº 353-A/2013 para a qualidade do ar interior e, na alínea a) do ponto 2 do artigo 12 do regulamento 882/2004 para a determinação de parâmetros como a contagem de *E. coli* em bivalves por laboratórios acreditados.

A acreditação é vantajosa, na medida em que o laboratório passa a ter a capacidade de evidenciar o nível de qualidade com que trabalha. A importância da acreditação traduz-se na confiança que o laboratório transmite ao mercado, pois o facto de um laboratório estar acreditado significa que está organizado segundo princípios, práticas de gestão e técnicas adequadas. A um outro nível, a acreditação é um facilitador do comércio internacional uma vez que o resultado analítico emitido por um laboratório acreditado é válido noutro país que adote o mesmo sistema de qualidade e que seja signatário dos Acordos de Reconhecimento Mútuo (Almeida & Pires 2006).

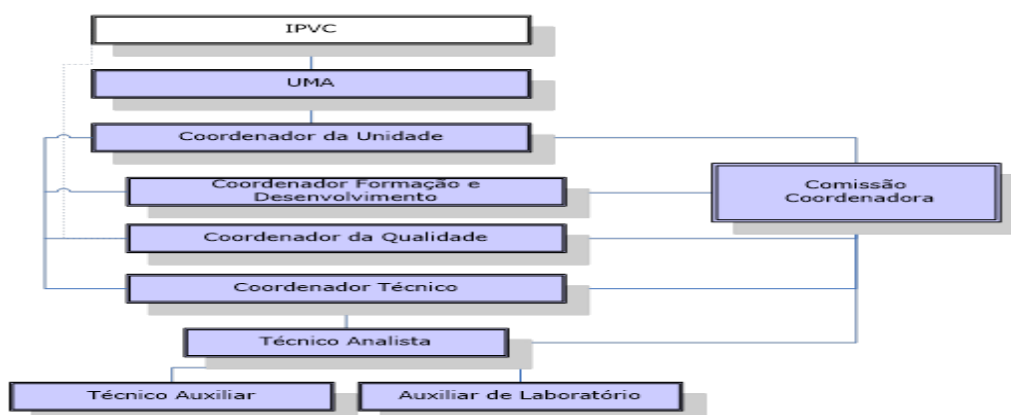
CAPÍTULO 2 – A UNIDADE DE MICROBIOLOGIA APLICADA

O presente trabalho foi desenvolvido durante o estágio na UMA - Unidade de Microbiologia Aplicada, laboratório de microbiologia com acreditação IPAC segundo a NP EN ISO/IEC 17025. A UMA, é uma estrutura dedicada ao desenvolvimento e prestação de serviços especializados do Instituto Politécnico de Viana do Castelo (IPVC).

A Unidade de Microbiologia Aplicada (UMA), é uma estrutura do Instituto Politécnico de Viana do Castelo cuja principal atividade é a prestação de serviços analíticos na área de microbiologia. Localizada na Escola Superior de Tecnologia e Gestão (ESTG), o seu laboratório de ensaios possui acreditação IPAC (L0359) desde 2005, possuindo atualmente 22 ensaios acreditados na área da microbiologia das águas de consumo, géneros alimentícios e esfregaços de superfície.

O laboratório de Microbiologia da UMA, enquadra-se na necessidade da existência de organismos de prestação de serviços do IPVC pela procura de serviços especializados na área de análises microbiológicas. A UMA, que tem a sua estrutura orgânica apresentada a seguir (figura 1), é uma estrutura de apoio ao tecido económico e produtivo do Alto Minho, e está envolvida em processos de controlo da qualidade e vigilância higio-sanitária no sector alimentar.

Figura 1: Estrutura orgânica da UMA



A UMA, pretende tornar-se um laboratório de referência no sector, tendo como missão o desenvolvimento de metodologias analíticas que possam complementar a oferta na área das análises microbiológicas das águas de consumo, géneros alimentícios e esfregaços de superfície com elevado rigor e critérios de qualidade que permitam o seu devido reconhecimento.

O laboratório de microbiologia da UMA, está inserido na região do Alto Minho que engloba 10 municípios, com um número cada vez maior de indústrias do sector agroalimentar (pequenas e médias empresas) com pouca capacidade laboratorial instalada e em que a UMA é o único laboratório de microbiologia com ensaios acreditados na região.

O laboratório da UMA foi concebido para a realização de procedimentos analíticos na área de microbiologia de acordo com diretrizes e linhas de orientação internacionalmente aceites para o trabalho em salas brancas em condições assépticas, e particularmente considerando os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025:2005 no que diz respeito à sua organização, funcionamento e instalações. A NP EN ISO/IEC 17025 é a versão portuguesa da norma ISO/IEC 17025, que foi elaborada e publicada internacionalmente pela International Organization for Standardization (ISO) e em conjunto pela International Electrotechnic Commission (IEC). Esta norma, apresenta todos os requisitos (gestão e técnicos) necessários para delinear as atividades do laboratório (ensaios e /ou calibrações).

A UMA está dotada de equipamento e infraestruturas adequadas que garantem o cumprimento dos padrões de qualidade dos serviços prestados, bem como a segurança dos operadores e meio ambiente. O laboratório da UMA foi projetado de acordo com o princípio da marcha em frente, numa área total de 100 m², constituída por espaços e salas devidamente separadas de acordo com as atividades que se podem exercer:

- Antecâmara: lavagem de mãos e guarda roupa;
- Receção: sector administrativo e arquivo;
- Sala de lavagem: lavagem de material, desinfeção e esterilização;

- Sala de preparação de meios e soluções;
- Sala de bioquímica;
- Sala de incubação: onde se encontram as estufas utilizadas para a incubação dos meios de cultura;
- Área de trabalho: onde ocorre o processamento de amostras;

O laboratório da UMA, foi construído e equipado de acordo com as normas de segurança necessárias, para a manipulação de organismos de risco biológico da classe II. O sistema de ventilação de ar para o interior do laboratório é introduzido através de um sistema de filtro absoluto tipo HEPA que permite a manutenção da temperatura do ar entre os 18 a 27 °C.

CAPÍTULO 3 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO

Durante o estágio, foram acompanhadas atividades relacionadas com a preparação de material e meios de cultura, o processamento analítico das amostras, controlo da qualidade dos ensaios, auditorias técnicas (internas e externas), implementação de normas com vista a acreditação, entre outras. A estagiária teve ainda a oportunidade de realizar um trabalho específico de controlo da qualidade de alimentos, no âmbito da colaboração da UMA com uma unidade industrial do Norte, nomeadamente a avaliação da qualidade da água de demolha e do bacalhau (produto final).

A realização deste trabalho tem como objetivo geral o acompanhamento das atividades realizadas no laboratório da UMA, bem como o envolvimento na rotina laboratorial com todas as exigências de adaptação às múltiplas tarefas em áreas distintas como é característico de um laboratório de pequena/média dimensão.

Para o alcance do objetivo geral definido acima, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Acompanhar a rotina do laboratório;
- Participar em ensaios no laboratório (ensaios de controlo da qualidade e ensaios interlaboratoriais) com a perspetiva de qualificação técnica;
- Participar em projetos do laboratório que envolvem a utilização, desenvolvimento e implementação de novos métodos:
 1. Implementação do método de Contagem de *Escherichia coli*, Contagem de coliformes e Contagem de *Clostridium perfringens* em águas de consumo;
 2. Controlo da qualidade microbiológica da água de demolha e do bacalhau demolido;

3.1. Conhecimento do laboratório, suas práticas de trabalho e medidas preventivas de contaminação

Tal como já foi referido, o laboratório da UMA, é classificado como um laboratório de confinamento físico do nível 2 de segurança biológica, o que significa que, é indicado para trabalhar com agentes biológicos da classe II.

Desta forma, foi elaborado um código de boas práticas pelo laboratório de forma a responder às necessidades estabelecidas pela OMS (2004), e que contempla os requisitos mínimos que estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1: Relação entre grupo de risco com o nível de segurança, os riscos, as práticas e os equipamentos

Grupo de risco	Nível de segurança biológica	Risco	Práticas de laboratório e equipamento de proteção
2	Básico - Nível 2 de segurança biológica	<ul style="list-style-type: none">• Risco individual moderado;• Risco coletivo baixo;	<ul style="list-style-type: none">• Boas práticas de microbiologia;• EPI adequado;• Sinal de perigo biológico na entrada;• CSB nível II;• Laboratório projetado para facilitar limpeza eficaz;

Fonte: adaptado de Armada *et al* (2014)

O Código de Boas Práticas Laboratoriais (CBPL), estabelece as normas básicas de segurança, de higiene e de comportamento, a ter em conta no acesso às instalações do laboratório. O CBPL aplica-se a todos os que exercem funções ou realizam atividades na UMA. As principais normas de segurança no laboratório da UMA baseiam-se no cumprimento de várias regras, de forma a que fiquem asseguradas as condições de segurança dos diferentes operadores, dos visitantes e das amostras.

De forma a assegurar a redução de riscos por contaminação cruzada, o laboratório da UMA foi projetado de acordo com o princípio da marcha em frente. Na UMA, considera-se também a prática de gestão de atividades em espaços/salas separados/as, onde está devidamente definido quais as atividades que se podem exercer. O CBPL foi assim o primeiro documento

apresentado no início do estágio para apresentação do laboratório (com visita às instalações) e das regras básicas de funcionamento do mesmo.

Logo no início do estágio, e antes de poder fazer alguma atividade no laboratório da UMA, foi fornecida formação sobre este documento e sobre o procedimento de higiene e segurança, seguido de um tempo de breve estudo e da realização de um questionário. Com este questionário, o laboratório pretende garantir que estão reunidas as condições mínimas de segurança para dar início a qualquer atividade, caso contrário é reforçada a formação.

3.2. Trabalho técnico

Durante o estágio foi possível realizar trabalho nos diferentes setores do laboratório tal como a seguir se descreve. As diferentes atividades e os respetivos registos, foram inicialmente realizados com o acompanhamento de técnicos qualificados, e mais tarde, de forma cada vez mais autónoma.

3.2.1. Descontaminação e esterilização

3.2.1.1. Higiene e limpeza do laboratório

No início do estágio, foi dada formação sobre o procedimento de higiene e limpeza do laboratório. Este procedimento, elaborado segundo os princípios da NP EN 12741:2000, estabelece uma linha de ação relativa à higiene e limpeza, segurança e gestão de resíduos, referindo que, as superfícies de trabalho, chão e paredes, devem ser limpas regularmente. Para tal, a UMA dispõe de um plano de limpeza, que estabelece a periodicidade da sua realização, material e desinfetante de modo a manter o laboratório limpo.

A limpeza das bancadas de trabalho é realizada semanalmente por técnicos qualificados, sendo efetuada a verificação da sua eficácia através do uso de placas de contacto (Biomérieux, França) e esfregaços de superfície. O chão e as paredes são limpos com uma periodicidade diária e anual, respetivamente, ou sempre que necessário.

O laboratório da UMA definiu ainda, a periodicidade mínima com que o equipamento e as instalações devem ser limpos e desinfetados. Contudo, sempre que se verifique necessário, deve-se efetuar a limpeza dos mesmos. Neste processo, são utilizados desinfetantes, devidamente testados para garantir a sua eficácia.

A higienização do equipamento, sempre que necessária foi realizada respeitando as instruções existentes nos seus manuais de utilização e/ou respetivas instruções de trabalho.

3.2.1.2. Manuseamento e gestão de resíduos

Segundo a OMS (2004), considera-se resíduo tudo aquilo que se deve deitar fora. Nos laboratórios de microbiologia, o princípio dominante é que todo o material potencialmente infeccioso deve ser descontaminado, por esterilização em autoclave, por processos químicos ou por incineração.

A gestão de resíduos produzidos no laboratório da UMA é feita de modo a minimizar a libertação de organismos viáveis. Esta gestão envolve a classificação, acondicionamento e tratamento específico dos resíduos. Este processo, tem como objetivo a manutenção das condições de higiene e segurança dos operadores, equipamentos e instalações, a proteção ambiental e a preservação da imagem da UMA.

Durante o estágio foi dada formação sobre o procedimento documentado de gestão de resíduos que descreve as medidas para a prevenção, minimização, separação, manipulação, armazenamento, tratamento, transporte e eliminação final dos resíduos biológicos perigosos das atividades laboratoriais. Este procedimento foi desenvolvido em consonância com a NP EN 12740:2002 e com a OMS (2004), e compromete o laboratório com a minimização da produção de resíduos e, onde possível, com a recuperação de materiais.

Durante esta formação, foi também explicada a importância da triagem dos resíduos que eram produzidos e a influência da sua má execução para o desenvolvimento de toda a atividade no laboratório.

O laboratório adotou um sistema de identificação e separação de materiais e recipientes infecciosos, de acordo com as seguintes categoriais:

- **Grupo I – Resíduos equiparados a urbanos** (de serviços administrativos e gerais): resíduos não-contaminados (não-infecciosos) que podem ser reutilizados, reciclados ou eliminados como resíduos “domésticos” ordinários;
- **Grupo II – Resíduos laboratoriais não perigosos**, sem tratamento específico, podendo ser equiparados a urbanos;
- **Grupo III – Resíduos laboratoriais de risco biológico**: material contaminado para descontaminação em autoclave, lavagem posterior e reutilização ou reciclagem; Material contaminado para descontaminação em autoclave e eliminação;
- **Grupo IV – Resíduos laboratoriais específicos** tal como: material cortante contaminado (infeccioso) – agulhas hipodérmicas, lâminas de bisturi e vidro partido.

A triagem e o acondicionamento dos resíduos produzidos no laboratório da UMA é efetuada no local de produção com base na sua classificação. Assim, o laboratório adaptou a utilização de procedimentos e de contentores de cores e características distintas, devidamente identificados, para os resíduos, de modo a facilitar a diferenciação e identificação dos diferentes fluxos de resíduos e, prevenir a sua mistura inadvertida.

3.2.1.3. Ruturas e derrames envolvendo materiais perigosos

De acordo com o descrito na NP EN 12741:2000, a formação de aerossóis constitui o maior risco quando uma cultura ou amostra contaminada é derramada.

Na sequência da formação realizada no início do estágio, foram ainda explicados, os procedimentos que deverão ser executados em situação de ruturas e derrames de materiais perigosos.

A UMA, dispõe ainda, de um lava-olhos que deverá ser utilizado, caso haja necessidade de lavagem dos olhos do operador em virtude de uma contaminação química ou biológica, e de chuveiro que deverá ser utilizado caso a contaminação do próprio operador seja extensa. No entanto, para a utilização destes sistemas de segurança, há que ter em atenção se há incompatibilidades químicas, pois nessa situação não se poderá utilizá-los.

3.2.1.4. Esterilização e desinfeção de material

A esterilização é a eliminação ou destruição completa de todas as formas de vida microbiana, por meio de processos físicos ou químicos. A desinfeção é o processo que reduz ou elimina os microrganismos, mas não necessariamente dos endósporos bacterianos, de objetos inanimados. Esse processo não deve ser confundido com a esterilização, visto que é menos eficaz e poderá não eliminar totalmente todas as formas de vida microbiana.

No laboratório da UMA, o material pode ser esterilizado segundo dois métodos:

- Por calor seco, em estufa de esterilização de ar quente, pelo menos durante 1h a 170 °C;
- Por calor húmido, em autoclave, pelo menos durante 30min a 121 °C.

A esterilização é feita sempre em equipamento devidamente controlado (autoclave com estudo de perfil térmico, com controlo e registo de temperatura).

Por norma, utiliza-se a esterilização em autoclave, pois muitos dos materiais têm, ou são, de plástico, sendo ainda um processo mais rápido e de grande eficácia.

De forma a assegurar que a esterilização foi bem efetuada, utilizam-se indicadores de esterilização, tais como as ampolas de (indicador biológico de esterilização) Sterikon (Merck, Alemanha) ou fitas indicadoras de esterilização, sendo que todos os equipamentos de esterilização são devidamente controlados (através do estudo de perfil térmico e com controlo e registo de temperaturas).

Todas estas tarefas requerem a realização de registos, para evidenciar rastreabilidade nos processos.

3.2.2. Controlo diário dos equipamentos

Uma das principais atividades rotineiras desenvolvidas no laboratório, é o registo e controlo da temperatura dos equipamentos, para assegurar o estado de bom funcionamento do mesmo. No início do estágio foi explicado como fazer o registo e a importância do controlo diário da temperatura dos equipamentos.

O registo e controlo da temperatura dos equipamentos é realizado comparando o intervalo de temperaturas aceitáveis com o valor da temperatura apresentado no momento para determinado equipamento.

3.2.3. Preparação de meios de cultura

Nesta fase do estágio, foi dada formação sobre a metodologia geral para a preparação de diluentes, meios de cultura e outras soluções necessárias para a realização de análises microbiológicas, que se encontra descrito num procedimento do laboratório.

Neste procedimento, está estabelecido que o operador, antes de preparar o meio ou solução deve verificar se a água desionizada utilizada é de qualidade grau 3, de acordo com a ISO 3696:1987 e ISO 11133:2014. Para isso, quando se vai preparar um meio de cultura, deverá realizar-se a medição do pH e da condutividade da água desionizada, e registar no respetivo impresso. Esta tarefa, e respetivos registos, foram realizados sempre acompanhados pelos técnicos qualificados.

Nesta fase, foi também explicado que, antes de qualquer pesagem deve ser verificado o estado de higiene da balança, e se a bolha do nível da balança está no centro. Na UMA, as balanças são verificadas mensalmente com o uso de pesos adequados pelo técnico responsável.

A preparação dos meios de cultura é realizada segundo as indicações do fabricante ou das normas respetivas, tendo o cuidado de evitar libertação de pó e a formação de grumos.

A distribuição dos meios de cultura, diluentes e soluções é feita em recipientes adequados e de acordo com o necessário. A esterilização é feita preferencialmente em autoclave, sendo sempre seguidas as indicações do fabricante ou das normas respectivas.

De modo a garantir a sua rastreabilidade, todos os meios, diluentes e soluções preparados no laboratório da UMA, são devidamente identificados com o lote atribuído pelo laboratório, que consta na folha de registo da preparação de meios, e a respetiva data de validade.

3.2.3.1. Conservação dos meios de cultura, diluentes e/soluções

Os diluentes e meios de cultura preparados são conservados, consoante a indicação expressa na norma ou do seu fabricante. Geralmente estes são conservados em frasco / tubo rolhado, ao abrigo da luz a cerca de 5 ± 3 °C, durante um período máximo de três meses ou um mês à temperatura ambiente, de modo a evitar qualquer modificação da composição e desde que não ultrapasse o prazo de validade estabelecido pelo fabricante.

Salvo as indicações das respetivas normas ou as do fabricante, as soluções necessárias para testes de confirmações são conservadas em frascos escuros fechados à temperatura de 5 ± 3 °C, por um período máximo de três meses.

3.2.3.2. Controlo da qualidade de meios de cultura

O objetivo do controlo da qualidade de meios de cultura é, garantir a confiança de que os microrganismos-alvo serão sempre recuperados com uma determinada sensibilidade (Lightfoot & Maier, 2003). Na UMA, os meios de cultura são normalmente testados com microrganismos de referência.

3.2.4. Realização de análises

A realização de análises foi antecedita pela formação e observação, da preparação da bancada de trabalho, regras de trabalho em assepsia, importância da realização do trabalho junto à chama sobre o ponto de vista de segurança para o operador e da amostra.

Antes de dar início á realização das análises é necessário preparar a bancada de trabalho, através da sua desinfecção com álcool a 70%, seguida da colocação em lugar visível e acessível todo material que será necessário no momento da análise (por exemplo: pipetas, placas de Petri, garrafas de diluição, ansas, espalhadores, etc). Após a realização das análises é sempre efetuada a higienização e arrumação da bancada de trabalho.

No contexto da realização das análises foi realizada a participação nas atividades de preparação da suspensão inicial, inoculações e diluições sucessivas, incorporação de meios e espalhamento, contagens de colónias e seguimento de todas as etapas de confirmação.

3.2.5. Controlo da qualidade

O CQ num laboratório visa a obtenção da conformidade dos resultados obtidos durante as análises microbiológicas. A implementação de um sistema de CQ, permite garantir a qualidade no laboratório, reduzindo os erros de execução de análises, aumento da confiança e credibilidade do laboratório.

O CQ dos resultados no laboratório, envolve todos os aspetos da qualidade analítica, desde a amostragem (seleção e manuseamento de amostras), metodologias, ambiente, equipamento, meios de cultura e reagentes, pessoal, controlo de qualidade interna e externa.

O laboratório de microbiologia da UMA, adotou o uso das seguintes ferramentas de CQ:

- Brancos;
- Réplicas ou sementeira em duplicado;
- Ensaio em paralelo;
- Contagens em duplicado;
- Controlo com material de referência;
- Controlos dos meios de cultura;
- Controlo de esterilidade;
- Cartas de produtividade;

- Amostras cegas;
- Ensaio interlaboratoriais;

O controlo de qualidade analítico compreende 3 linhas de orientação:

- 1ª linha – que compreende um conjunto de procedimentos usados pelo operador para uma autoavaliação.
- 2ª linha – que compreende um conjunto de procedimentos observados periodicamente por uma pessoa diferente do operador.
- 3ª linha – onde se realizam comparações com o exterior, o que permite uma avaliação do desempenho do laboratório.

Durante o estágio, houve a oportunidade de realizar os controlos de qualidade de 1ª linha, 2ª linha e participar ainda no processamento de amostras provenientes de ensaios interlaboratoriais (3ª linha). Tal como a realização das análises, a realização dos controlos também foi acompanhada por técnicos qualificados, seguida de uma realização autónoma.

3.2.5.1. Brancos

O uso de brancos, permite fazer uma avaliação da esterilidade do processo da análise. Neste caso, a amostra é substituída por água estéril, sendo tratada como qualquer outra amostra. Esta ferramenta, representa o CQ da 1ª linha.

3.2.5.2. Ensaio em paralelo e sementeira em duplicado

Os ensaios em paralelo (por dois operadores), assim como a sementeira em duplicado (o mesmo operador), são ferramentas utilizadas para o treino de novos operadores ou domínio e aprendizagem de novos ensaios.

Após a realização dos ensaios em paralelo e/ou das sementeiras em duplicado, os resultados obtidos são validados, preenchendo a carta de duplicados correspondente. Esta ferramenta, representa o CQ da 1ª linha.

Estas ferramentas permitem também obter dados para o cálculo da precisão intermédia e da estimativa da incerteza (CQ da 2ª linha).

3.2.5.3. Contagens em duplicado

A contagem em duplicado, baseia-se na escolha aleatória de placas contadas por um operador, devendo ser recontadas pelo mesmo operador ou por um outro. Esta ferramenta representa o CQ da 1ª linha, e tem como objetivo, detetar diferenças nas contagens entre vários operadores. Para casos em que a contagem é feita pelo mesmo operador, o laboratório aceita a diferença até 5%, e quando é feita por operadores diferentes, aceita-se diferença até 10%.

Esta ferramenta, também pode ser utilizada como ferramenta para CQ da 2ª linha numa perspectiva de avaliação de tendências dos operadores.

3.2.5.4. Controlo com material de referência

O uso de material de referência para o controlo positivo ou negativo (qualitativo), representa o CQ da 1ª linha. O seu uso, é sempre feito em cada série de análises, independentemente da frequência e da quantidade de parâmetros de análises a realizar.

Os materiais de referência também são utilizados para o controlo da qualidade dos meios de cultura e para a realização de amostras cegas.

A preparação, manutenção e controlo dos materiais de referência do laboratório foi sempre realizada de acordo com o procedimento específico do laboratório para o manuseamento deste tipo de materiais.

3.2.5.5. Controlo dos meios de cultura

O CQ dos meios de cultura, tem como objetivo determinar os parâmetros de esterilidade, produtividade, seletividade e especificidade.

Na sua aquisição, os meios são acompanhados de um certificado de qualidade, que é avaliado para verificar o cumprimento com os requisitos da norma ISO 11133:2014 e do laboratório.

Após a preparação do meio, são avaliadas as características visuais, tais como a cor, o aspeto e a consistência, de igual modo, as características físicas (pH),

que devem estar de acordo com as indicações do fornecedor. O meio de cultura é rejeitado, caso se encontre fora dos limites especificados.

3.2.5.6. Controlo de esterilidade

Após preparação do meio de cultura incuba-se uma placa ou tubo nas condições de tempo e temperatura descritas no método de ensaio do organismo que se pretende pesquisar. Ao fim deste tempo, não deverá haver qualquer crescimento no meio, caso contrário o lote é rejeitado.

3.2.5.7. Cartas de produtividade

A produtividade é definida como o nível de recuperação do microrganismo alvo no meio de cultura em condições definidas e a seletividade, como o grau de inibição de um organismo não alvo no mesmo meio e nas mesmas condições. A especificidade, por seu lado, é demonstrada pela capacidade de microrganismos não alvo não serem inibidos, mas apresentarem, no mesmo meio e nas mesmas condições, características visuais diferentes do microrganismo alvo.

A norma ISO 11133:2014 estabelece critérios para a realização e avaliação destes parâmetros de controlo de qualidade.

Em rotina o laboratório utiliza os MR para fazer o controlo dos meios de cultura, diluentes e reagentes utilizados nas análises.

Sempre que se prepara um novo lote de meio, são realizados os testes de produtividade / seletividade / especificidade. Os resultados de produtividade são introduzidos numa carta de controlo (carta de produtividade), o que permite saber se o meio ainda é adequado para a realização dos ensaios analíticos (CQ de 1ª linha).

A carta de produtividade é construída com os primeiros valores obtidos (pelo menos 10 inicialmente e depois atualizada quando se atingir aos 20) e são estabelecidos os limites de aviso, de controlo e critérios de aceitação, para que possa ser utilizada em rotina de forma a detetar possíveis situações anormais ou as que possam ocorrer (CQ de 2ª linha).

3.2.5.8. Amostras cegas

O uso de amostras cegas, baseia-se na contaminação interna das amostras utilizando MR, com o objetivo de conhecer a precisão e exatidão dos resultados produzidos. Geralmente, as amostras cegas, são utilizadas em conjunto, com os duplicados, para conhecer e avaliar o desempenho dos operadores, nomeadamente estagiários, funcionando com ferramenta de melhoria da qualidade.

A utilização de MR (quantitativos) ou padrões análogos, como amostras cegas, permite também conhecer a exatidão do método.

O laboratório considera, para todos os efeitos, as amostras dos ensaios interlaboratoriais, como amostras cegas, na avaliação do seu desempenho.

3.2.5.9. Ensaios interlaboratoriais (EIL)

A realização de ensaios de comparação interlaboratoriais, representa um CQ externa da 3ª linha. A ferramenta EIL é referente à realização e avaliação de ensaios do mesmo item ou matéria, por dois ou mais laboratórios, de acordo com as condições pré-estabelecidas pela entidade promotora.

A participação neste tipo de ensaios, permite ao laboratório fazer a sua avaliação de desempenho, conhecendo a qualidade dos resultados obtidos, face aos resultados gerais para esse ensaio.

A participação em ensaios de comparação interlaboratorial é um procedimento obrigatório para a acreditação de método analítico num laboratório de ensaios e/ou calibração.

3.2.6. Manutenção de culturas de referência

Segundo Brumano *et al* (2011), o congelamento, é o método mais comum de conservação de culturas bacterianas em laboratórios. Na UMA, a manutenção de culturas de referências é realizada de acordo com o descrito na norma ISO 11133:2014.

De acordo com esta norma, as culturas usadas na manutenção de material de referência, tem sempre como fonte de origem, estirpes de referência obtidas a partir de uma coleção oficial, internacional.

Os métodos de conservação aplicados no laboratório, envolvem a técnica de cultivo contínuo e a ultracongelação ($< -70\text{ }^{\circ}\text{C}$). A técnica de cultivo contínuo, é realizada de modo a manter a disponibilidade da cultura de trabalho para a utilização nos ensaios, estas culturas, são armazenadas à temperatura de $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante um período máximo de 30 dias. A técnica de ultracongelação, é realizada através do congelamento da cultura com a adição de glicerol a 30%. Neste caso, a cultura de referência, pode ser congelada à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (stock de referência) durante três anos, ou a $-20 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (stock de cultura) durante um ano.

Para a realização de testes de produtividade / seletividade / especificidade são também preparados stock de inóculo a partir do stock de cultura, em concentrações adequadas para os testes, segundo a ISO 11133:2014 e conservando a $-20 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Assim como se descreve na ISO 11133:2014, sempre que se descongela um material de referência (em stock de referência, de cultura ou de inóculo), não se volta a congelar, descartando-o após utilização.

3.2.7. Auditorias

Durante a realização do estágio, a estagiária teve a oportunidade de participar em duas auditorias da qualidade, nomeadamente, numa auditoria interna devidamente planeada e integrada no programa de auditorias ao sistema de gestão da qualidade da UMA e numa auditoria externa, realizada pelo organismo de acreditação IPAC.

Uma vez que a UMA pretendia implementar novos métodos no laboratório, parte técnica das auditorias realizadas centrou-se sobretudo nesse objetivo, com vista, a avaliar o desempenho e a competência técnica do laboratório para realizar os novos métodos. A auditoria externa realizada pelo IPAC, neste caso foi

classificada como auditoria de extensão. Durante as auditorias, as principais atividades desenvolvidas pela estagiária foram:

- Participação na reunião de abertura e fecho das auditorias;
- Observação e acompanhamento de todo o processo de auditoria;
- Apoio ao operador auditado em atividades como: contagens de colónias, documentação de diferentes folhas de registo solicitadas pela equipa auditora, entre outras.

As auditorias da qualidade decorreram segundo um processo de amostragem (de atividades, de documentos e de colaboradores entrevistados). A participação em auditorias foi de grande valia, através destas foi possível aprofundar os conhecimentos teóricos obtidos durante as aulas, e obter uma visão prática do decurso de uma auditoria.

A auditoria permite verificar se o sistema de gestão da qualidade da entidade está conforme os requisitos específicos da norma, se está a funcionar de acordo com o seu sistema de gestão e se este respeita a norma. A realização desta deve garantir a melhoria contínua. Para tal, é importante que as auditorias sejam regulares e que possam abranger todas as atividades da empresa.

De acordo com a norma ISO 19011 (2012), as evidências da auditoria deverão ser avaliadas face aos critérios da auditoria, para se chegar às constatações da auditoria. As constatações da auditoria, podem indicar conformidade ou não conformidade com os critérios da auditoria. As não conformidades e as correspondentes evidências de auditoria que as suportem deverão ser registadas e revistas com o auditado para que reconheça a exatidão das evidências da auditoria e compreenda as não conformidades.

3.3. Qualificação como operadora

Como forma de avaliação de desempenho do laboratório, para os métodos e parâmetros de análises realizados, o laboratório de microbiologia da UMA tem participado em ensaios interlaboratoriais promovidos pela Public Health England.

Durante o período de estágio, desenvolveram-se várias análises para diferentes parâmetros no contexto da participação do laboratório em EIL.

Os resultados da estagiária obtidos durante as análises da participação do laboratório em EIL, assim como os outros resultados obtidos em diferentes análises realizadas na UMA, como duplicados, serviram para a obtenção de dados suficientes para a sua qualificação e avaliação de desempenho em diferentes métodos e parâmetros de análise.

A tabela 2 representa a avaliação de desempenho obtida durante o estágio que decorreu no laboratório da UMA.

Tabela 2: Avaliação de desempenho

	Parâmetro usado	Método	Ensaio		
			Total de análises efectuadas	Pontuação (%)	Observação
Alimentos	Contagem de Microrganismos a 30°C	ISO 4833-1: 2013	21	100%	Qualificado
	Contagem de E.Coli	ISO 16649-2: 2001	19	100%	Qualificado
	Contagem de Bacillus cereus a 30°C	ISO 7932: 2004	15	100%	Qualificado
	Contagem de Estafilococcus Coagulase Positiva	ISO 6888-1: 1999/ Amd 1:2003	15	100%	Qualificado
	Contagem de Enterobacteriaceas	ISO 21528-2: 2004	19	95%	Qualificado
	Pesquisa de Salmonella	ISO 6579: 2002	5	100%	Qualificado
	Contagem de Listeria monocytogenes	ISO 11290-2: 1998/Amd.1:2004	19	100%	Qualificado
Águas	Contagem de Microrganismos a 36°C	ISO 6222: 1999	11	77%	Qualificado
	Contagem de Microrganismos a 22°C	ISO 6222: 1999	11	86%	Qualificado
	Contagem de Enterococos intestinais	ISO 7899-2:2000	10	100%	Qualificado
	Contagem de Clostridium perfringens	IT-31 Ed. 4	10	100%	Qualificado
	Contagem de Coliformes MLSA	ISO 9308-1: 2000	9	100%	Qualificado
	Contagem de Coliformes CCA	ISO 9308-1: 2014	9	100%	Qualificado
	Contagem de E.Coli MLSA	ISO 9308-1: 2000	10	100%	Qualificado
	Contagem de E.Coli CCA	ISO 9308-1: 2014	10	100%	Qualificado
Superfícies	Contagem de Microrganismos a 30°C S	ISO 4833-1: 2013	10	90%	Qualificado
	Contagem de E.Coli S	ISO 16649-2: 2001	10	100%	Qualificado
	Contagem de Enterobacteriaceas S	ISO 21528-2: 2004	10	100%	Qualificado
Operadores	Pesquisa de E.coli	ISO 16649-2: 2001	10	100%	Qualificado
	Pesquisa de Coliformes	NP 3788:1990	10	100%	Qualificado
	Pesquisa de S.aureus	NP 2260:1986	10	100%	Qualificado

Observando os resultados e utilizando os critérios estabelecidos pelo laboratório, a estagiária está qualificada para a realização autónoma no laboratório da UMA de todos os ensaios indicados na tabela 2.

A qualificação de operadores pela UMA, tomou como base o requisito 5.2.1 da ISO/IEC 17025:2005. Para cumprir a este requisito da norma, o laboratório estabeleceu um procedimento técnico para a qualificação, manutenção e requalificação dos operadores.

Assim, para a qualificação de novos operadores, a UMA estabeleceu que a pontuação mínima para obter a qualificação deverá ser \geq a 75% ou casos em que o novo operador apresente 4 ensaios consecutivos com resultados satisfatórios e / em 6 ensaios alternados ter obtido resultados satisfatórios. O número mínimo de análises estabelecidas para a qualificação é 4, podendo estas 4 análises terem sido realizadas em duplicados e / em participação dos EIL.

3.4. Implementação de novos métodos

A implementação de um método consiste na sistematização e confirmação de que o método cumpre todos os requisitos exigidos para uma atividade ou uso pretendido. A implementação de novos métodos ocorre sempre que surge uma necessidade de um novo ensaio no laboratório ou quando surge uma modificação de métodos normalizados e já validados.

Na implementação de novos métodos, o laboratório deve dispor de condições (meios e critérios) que demonstrem que os ensaios dão origem aos resultados esperados.

Um dos passos iniciais neste processo, e que pode condicionar a definição de toda a metodologia de trabalho, é a identificação das fontes que contribuem para a quantificação da incerteza de medição do método. A incerteza da medição, é definida como um parâmetro, associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensurada (ISO 29201, 2012). É uma medida da imprecisão. O parâmetro é expresso como uma incerteza padrão ou incerteza padrão relativa. Existem

várias formas de abordar a metodologia de quantificação desta incerteza, tendo o laboratório optado pela abordagem global, conforme o descrito na norma ISO 29201:2012.

Na abordagem global não é necessário quantificar ou saber exatamente quais as causas da incerteza. De acordo com esta abordagem, uma vez avaliada a incerteza para um dado método, aplicado num determinado laboratório, esta pode ser aplicada de forma fiável aos resultados obtidos com o mesmo método (ISO 29201, 2012).

Uma modificação da abordagem global do modelo original, que tem em consideração a variabilidade operacional e variabilidade intrínseca, está livre da restrição das baixas contagens, que ocorre frequentemente em amostras de águas para consumo humano e alimentos prontos para consumo.

Segundo a norma ISO 29201 (2012), a abordagem global baseia-se, assim, na estimativa experimental do desvio padrão e da reprodutibilidade do resultado final do ensaio. Este desvio padrão corresponde a uma incerteza padrão combinada.

De forma a reduzir a variabilidade operacional, são avaliadas todas as fases do método, desde a amostragem à emissão do resultado, identificando todos os pontos críticos e metodologias de controlo e são resumidas numa matriz de risco. A tabela 3 representa o exemplo das fontes de incerteza identificadas, por exemplo, no ensaio de Contagem de coliformes e *E. coli* por filtração em membrana em águas do consumo humano.

Tabela 3: Fontes de incerteza - Contagem de coliformes e *E.coli*Fontes de incerteza nos ensaios quantitativos – Amostras de água de consumo Humano – Contagem Coliformes e *E.coli* por FM

Etapas do ensaio	Fontes de incerteza (fatores de erro)	Frequência	Impacto	Análise de Risco	Medida Preventiva	Controlo Interno	Documentos/ Registos
Preparação dos meios de cultura	Medições (massas e volumes)	1	3	3	Utilização adequada da balança Calibração externa das balanças Treino do operador	Verificação da balança Avaliação do desempenho dos operadores Verificação dos volumes com a proveta	Certificado de calibração i047 Registo de verificação intermédia de balanças i021 Registos de preparação de meios de cultura, diluentes e soluções
	Material de laboratório	1	3	3	Seleção do fornecedor Material descartável esterilizado Material recuperado com controlo de esterilidade Manutenção e ensaio de perfil da autoclave de esterilização	Avaliação dos fornecedores Prazos de validade da esterilidade Integridade das embalagens Controlo dos ciclos de esterilização Fita indicadora de esterilização	Rótulos e indicadores de esterilização Certificados do material descartável i033 Controlo de temperatura Certificados do ensaio de perfil da autoclave de esterilização
	Material recuperado no Laboratório	1	3	3	Descontaminação lavagem e preparação/esterilização Indicação da data/prazo de validade da esterilização nas etiquetas do indicador Manutenção e ensaio de perfil da autoclave de esterilização	Integridade do acondicionamento / embalagem Controlo dos ciclos de esterilização Ensaio de perfil da Autoclave de esterilização Controlo do prazo de validade Fita indicadora de esterilização Sterikon	Certificado do perfil térmico da autoclave de esterilização i033 Controlo de temperatura
	Equipamentos	1	2	2	Plano de Manutenção e limpeza	Manutenção periódica dos equipamentos	i027 Registos de limpeza das instalações e equipamentos i017 Registo de utilização do equipamento i009 Relatório de não conformidade i007 Registo do equipamento
	Meios de cultura / reagentes	1	3	3	Respeitar a composição, instruções de preparação e conservação da Norma de ensaio do fabricante dos meios de cultura Meios prontos a utilizar solicitar o certificado de qualidade e respeitar as instruções do fabricante (conservação e prazos de validade)	Controlo de esterilidade dos lotes fabricados no laboratório Controlo positivo por lote Controlo negativo por lote Ensaio em Branco Avaliação da produtividade do meio de cultura	Certificado dos lotes dos fabricantes i021 Registos de preparação de meios de cultura, diluentes e soluções i045 Registos de controlo de meios i110 Carta de Controlo de Produtividade
Amostragem	Material de laboratório	1	2	2	Seleção do fornecedor Material descartável esterilizado	Avaliação dos fornecedores Integridade das embalagens Controlo do prazo de validade	Certificados do material descartável
	Troca de amostras	1	3	3	Marcação inequívoca dos frascos das amostras	Verificação sistemática dos rótulos das amostras	Marcadores de tinta indelevel
Transporte	Temperatura no transporte	1	1	1	Recomenda-se temperatura de 5±3 °C	Verificar o estado dos termocumuladores e das caixas térmicas	i020 Folha de registo de amostra
Receção da amostra	Temperatura na receção	1	1	1	Recomenda-se temperatura de 5±3 °C	Verificação da conformidade com os critérios de aceitação das amostras	i020 Folha de registo de amostra
	Tempo entre a colheita e a receção no laboratório	1	1	1	Recomenda-se tempo máximo de 24 horas	Verificar a data e hora de colheita na receção	i020 Folha de registo de amostra

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Assim, para fazer a implementação de um método, o laboratório deve realizar diversos ensaios do método que pretende implementar, até obter no mínimo 30 resultados positivos. Estes resultados, devem ser obtidos preferencialmente em amostras naturalmente contaminadas, mas caso isso não seja possível, poderão ser utilizadas amostras artificialmente contaminadas com material de referência.

No final, o laboratório deve elaborar um relatório de implementação que deverá conter toda a informação e procedimentos levados a cabo no ato da realização dos ensaios de implementação.

A avaliação em auditoria, num processo de acreditação, tem o papel de validar os métodos implementados, através do reconhecimento da competência técnica do laboratório para a realização dos ensaios, segundo procedimentos regidos por requisitos específicos.

Na implementação dos novos métodos e na verificação comparativa da *performance* destes, a estagiária acompanhou e apoiou a responsável técnica nas diferentes atividades, quer laboratoriais, quer de tratamento dos resultados.

3.4.1. Implementação do método de contagem de *E. coli* e contagem de *Clostridium perfringens* em águas

A implementação de novos métodos de contagem de *E. coli* e contagem de *Clostridium perfringens* em águas para consumo humano, foi uma necessidade, sobretudo, devido a publicação das novas normas ISO 9308-1:2014 e ISO 14189:2013. De facto, houve uma alteração dos métodos de análise para estes parâmetros, pela entidade reguladora do sector (ERSAR). Com a publicação da diretiva (UE) 2015 / 1787 da Comissão a 6 de outubro de 2015, são alterados os anexos II e III da diretiva 98 / 83 / CE relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, são fixados os métodos de referência para os parâmetros microbiológicos a utilizar pelos laboratórios a partir de novembro de 2017. Com esta alteração, os documentos de referência atualmente utilizados pelo laboratório passarão a obsoletos, impedindo a manutenção da atual acreditação.

Além disso, a acreditação dos ensaios analíticos conducentes ao cumprimento da legislação, introduzida em Portugal pelo Decreto-Lei nº 306 / 2007 de 27 de agosto, é agora também fixada pela diretiva (UE) 2015 / 1787.

Assim, e para aproveitar a auditoria externa pelo IPAC de outubro de 2016, para fazer a avaliação da implementação e acreditação dos métodos analíticos, o laboratório optou pela implementação destes novos métodos ainda em 2016.

No período de estágio, a estagiária juntamente com os outros operadores do laboratório realizaram atividades conducentes à implementação de novos métodos para as águas de consumo humano, nomeadamente:

- Contagem total de *E. coli* e de coliformes por filtração em membrana;
- Contagem de *Clostridium perfringens* por filtração em membrana.

Durante este período, a principal atividade realizada pela estagiária foi a realização de análises microbiológicas em águas de consumo para os 2 parâmetros indicados acima, bem como a preparação de meios utilizados nas análises e a realização de todos os procedimentos previstos para o controlo de qualidade de primeira linha no laboratório.

3.4.1.1. Implementação do método de Contagem de *Clostridium perfringens* em águas

Antes da implementação do novo método, a contagem de *Clostridium perfringens* através da filtração por membrana em águas de consumo humano, tinha como referência o documento da HPA w5i3.1:2005. Segundo este documento, o laboratório utilizava o meio de cultura TSC (Biokar, França), e a confirmação em meios de GL (Liofilchem, Itália) e de NMA (Pronadisa, Espanha), que permitem determinar a motilidade, a redução de nitritos, a fermentação de lactose, a produção de gás e a hidrólise de gelatina.

Para a contagem de *Clostridium perfringens*, a implementação do novo método implicou apenas a introdução da confirmação de *Clostridium perfringens*, utilizando apenas o teste da fosfatase ácida. Deste modo, foram realizados testes de confirmação com a fosfatase ácida, em simultâneo com os testes de confirmação em gelatina lactosada e em agar de nitrato de mobilidade, para fazer a comparação dos resultados obtidos nos dois testes.

3.4.1.1.1. Características da *performance* na implementação

3.4.1.1.1.1. Cálculo de sensibilidade, especificidade, eficiência, seletividade, razão de falsos positivos e razão de falsos negativos

Estes parâmetros estão relacionados com a % relativa de colónias ou amostras com resultado positivo ou negativo comparado com o resultado “verdadeiro” ou “esperado”. Após realização de 18 amostras com resultados presuntivos positivos (6 naturais, 5 de ensaios interlaboratoriais e 7 amostras artificialmente contaminadas), e utilizando o novo procedimento descrito na ISO 14189:2013,

os resultados das confirmações das colónias foram colocados na forma descrita na tabela 4:

Tabela 4: Forma de apresentação dos resultados da contagem

Contagens confirmadas	---	Contagem presumível		----
		+	-	
	+	A	B	a+b
	-	C	D	c+d
	---	a+c	b+d	n
Categoria de características de performance				
a – número de colónias típicas que confirmaram como o organismo alvo (verdadeiro positivo)				
b – número de colónias atípicas que confirmaram como o organismo alvo (falso negativo)				
c – número de colónias típicas confirmadas como não sendo organismo alvo (falso positivo)				
d – número de colónias atípicas que confirmaram como organismo não alvo (verdadeiro negativo)				

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Assim, para a contagem de *Clostridium perfringens* obtiveram-se os seguintes valores apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Resultados da contagem de *Clostridium perfringens*

Contagens confirmadas		Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> (presumível)		
	---	+	-	Soma
	+	374	0	374
	-	23	49	72
	Soma	397	49	446

Fonte: Relatório de implementação da UMA

As características de performance para a contagem de *Clostridium perfringens* são calculados a partir destes valores e foram resumidos na tabela 6.

Tabela 6: *Performance* do método

Performance do método – Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>				
Categorias			Valores norma ISO 14189: 2013	Valores laboratório
Sensibilidade	=	$a / (a+b)$	94%	100,0%
Especificidade	=	$d / (c+d)$	87%	68,1%
Taxa de falsos positivos	=	$c / (a+c)$	10%	5,8%
Taxa de falsos negativos	=	$b / (b+d)$	9%	0,0%
Seletividade	=	a / n	-0,15%	0,839%
Eficiência	=	$(a+ d) / n$	92%	95%
Gama			10 a 80 ufc	10 a 100 ufc
Taxa de recuperação			>72%	85%

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Para verificar se os métodos de confirmação apresentam diferenças significativas, foi aplicada a análise de variância aos resultados de cada um dos métodos para cada uma das amostras analisadas, cujos resultados se apresentam na tabela 7.

Aplicando a ANOVA, fator único, aos resultados obtidos temos os seguintes valores.

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA)

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Colónias Confirmadas (+) pela IT-31 Ed4	15	65	4,333333	18,95238095		
Colónias Confirmadas (+) pela ISO 14189:2013	15	64	4,266667	19,20952381		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,033333	1	0,033333	0,001746943	0,966957594	4,195972
Dentro de grupos	534,2667	28	19,08095			
Total	534,3	29				

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Analisando estes resultados, como o *valor P* (0,966957594) é superior a 0,05 e $F_{cal} < F_{crítico}$, para um coeficiente de confiança de 95%, podemos afirmar que não existem diferenças significativas entre os dois métodos de confirmação.

Após verificar, com os testes comparativos dos dois métodos, que estes não apresentam diferenças significativas, foi considerado que o uso do novo método é mais vantajoso para o laboratório, visto que a sua aplicação é mais fácil e a duração da análise é mais curta, o que permite a rápida apresentação dos resultados aos clientes.

Este método foi auditado no âmbito da auditoria externa realizada pelo IPAC, que decorreu a 21 de outubro de 2016, tendo sido, concedida a acreditação do método a 19 de janeiro de 2017.

3.4.1.2. Implementação do método de *E. coli* e coliformes em águas

Antes da implementação do novo método, a detecção e contagem de *E. coli* e coliformes em águas de consumo humano, tinha como referência a recomendação ERSAR nº 01/2015, tendo esta sido elaborada com base na norma ISO 9308-1:2000 Cor.1:2007. Segundo a recomendação, o laboratório utilizava o meio de cultura MLSA (Oxoid, Inglaterra), e confirmação através dos testes de oxidase, de índole e observação da fluorescência sob a luz ultravioleta.

A implementação do novo método para contagem de *E. coli* e coliformes, está referida na norma ISO 9308-1:2014. Este método, aplica-se às amostras de água para consumo humano, através da filtração por membrana. No entanto, este método só é aplicado a amostras de água com baixa contaminação. O meio de cultura utilizado é o CCA (Biokar, França). A detecção de bactérias coliformes depende da sua atividade β -d-galactosidase e a *E. coli* é identificada pela sua atividade β -d-glucuronidase adicional.

O novo método (ISO 9308-1:2014) foi realizado sempre em simultâneo com o outro método acreditado (ISO 9308-1:2000) e em uso no laboratório.

3.4.1.2.1. Características da performance na implementação

3.4.1.2.1.1. Cálculo de sensibilidade, especificidade, eficiência, seletividade, razão de falsos positivos e razão de falsos negativos

Estes parâmetros estão relacionados com a % relativa de colónias ou amostras com resultado positivo ou negativo comparado com o resultado “verdadeiro” ou “esperado”. Após a realização de 74 amostras com resultados presuntivos positivos (42 naturais, 14 de ensaios interlaboratoriais e 18 amostras artificialmente contaminadas), os resultados das confirmações das colónias foram colocados na forma, como referido na tabela 4.

Assim, para a contagem de coliformes temos os seguintes valores, apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Resultados da contagem de coliformes

Contagens confirmadas	Contagem de coliformes (presumível)			
	---	+	-	Soma
	+	8066	17	8083
	-	13	171	184
	Soma	8079	188	8267

Fonte: Relatório de implementação da UMA

As características de *performance* para a contagem de coliformes são calculadas a partir destes valores e foram resumidos na seguinte forma (ver tabela 9).

Tabela 9: *Performance* do método

Performance do método – Coliformes			
Categorias		Valores norma ISO 9308: 2014	Valores laboratório
Sensibilidade	= $a / (a+b)$	91%	99,8,0%
Especificidade	= $d / (c+d)$	94%	92,9%
Taxa de falsos positivos	= $c / (a+c)$	5%	0,2,%
Taxa de falsos negativos	= $b / (b+d)$	11%	9,0%
Seletividade	= a / n	-0,32%	0,976%
Eficiência	= $(a+ d) / n$	92%	100%
Gama		10 a 100 ufc	10 a 100 ufc
Repetibilidade		0,035	0,032
Reprodutibilidade		0,114	0,066
Taxa de recuperação		>70%	83%

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Para o parâmetro de contagem de *E. coli*, temos os valores apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Resultados da contagem de *E.coli*

Contagens confirmadas	Contagem de <i>E. coli</i> (presumível)			
	---	+	-	Soma
	+	5013	703	5716
	-	107	3044	3151
	Soma	5120	3747	8867

Fonte: Relatório de implementação da UMA

As características de *performance* para a contagem de *E. coli* são calculadas a partir destes valores e foram resumidos na seguinte forma (ver tabela 11).

Tabela 11: *Performance* do método

Performance do método - <i>E. coli</i>			
Categorias		Valores norma ISO 9308: 2014	Valores laboratório
Sensibilidade	= $a / (a+b)$	94%	87,70%
Especificidade	= $d / (c+d)$	97%	96,6%
Taxa de falsos positivos	= $c / (a+c)$	6%	2,1%
Taxa de falsos negativos	= $b / (b+d)$	3%	18,8%
Seletividade	= a / n	-0,78%	0,565%
Eficiência	= $(a+ d) / n$	96%	91%
Gama		10 a 100 ufc	10 a 100 ufc
Repetibilidade		0,046	0,047
Reprodutibilidade		0,127	0,178
Taxa de recuperação		>80%	80%

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Após uma análise comparativa dos resultados dos dois métodos, não foram identificadas diferenças significativas, sendo que o novo método tem ainda a vantagem de ser mais rápido.

No decurso dos EIL, verificou-se uma melhoria significativa dos resultados para estes parâmetros, o que permitiu melhorar o desempenho dos operadores e, consequentemente, do laboratório.

Estes métodos foram auditados no âmbito da auditoria externa realizada pelo IPAC, que decorreu a 21 de outubro de 2016, tendo sido, concedida a acreditação dos métodos a 19 de janeiro de 2017.

3.4.1.3. Cálculo das incertezas

Para o cálculo da incerteza na contagem de *Clostridium perfringens* em agar TSC para o ano de 2016, foram utilizados os valores obtidos no período de 21 de janeiro de 2015 a 17 de fevereiro de 2016. Para o cálculo da incerteza operacional relativa foram utilizados dados desde 3 de dezembro de 2013 a 17 de fevereiro de 2016.

A tabela 12 apresentada a seguir, mostra-nos o cálculo da incerteza na contagem de *Clostridium perfringens*.

Tabela 12: Cálculo de incerteza - *Clostridium perfringens*

Matriz: **Águas de consumo**

Período de Recolha 21-01-2015 a 17-02-2016

	n	20
Critério de precisão	CP	0,22
	n	10
Reprodutibilidade Intralaboratorial	$S_R = \sqrt{(\sum S_{Ri}^2/n)}$	0,06
Incerteza expandida	$* \sqrt{(SR^2+0,18861/(\sum C))}$	0,13
Incerteza Operacional Relativa	$u_{o,rel}$	0%

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Para o cálculo da incerteza na contagem de coliformes em CCA, foram utilizados os valores obtidos no período de 17 de fevereiro a 12 de julho de 2016.

A tabela 13 apresentada a seguir, mostra-nos o cálculo da incerteza na contagem de coliformes.

Tabela 13: Cálculo de incerteza – coliformes

Matriz: **Águas de consumo**

Período de Recolha 17-02-2016 a 12-07-2016

	n	14
Critério de precisão	CP	0,41
	n	14
Reprodutibilidade Intralaboratorial	$S_R = \sqrt{(\sum S_{Ri}^2/n)}$	0,10
Incerteza expandida	$* \sqrt{(SR^2+0,18861/(\sum C))}$	0,21
Incerteza Operacional Relativa	$u_{o,rel}$	16%

Fonte: Relatório de implementação da UMA

Para o cálculo da incerteza na contagem de *E. coli* em CCA foram utilizados os valores obtidos no período de 17 de fevereiro a 12 de julho de 2016. Os resultados são resumidos na tabela 14 apresentada a seguir.

Tabela 14: Cálculo de incerteza - *E.coli*

Matriz: **Águas de consumo**

Período de Recolha 17-02-2016 a 12-07-2016

	n	13
Critério de precisão	CP	0,34
	n	13
Reprodutibilidade Intralaboratorial	$S_R = \sqrt{(\sum S_{Ri}^2/n)}$	0,09
Incerteza expandida	$* \sqrt{(SR^2+0,18861/(\sum C))}$	0,18
Incerteza Operacional Relativa	$u_{o,rel}$	12%

Fonte: Relatório de implementação da UMA

3.4.1.4. Avaliação de desempenho nos ensaios interlaboratoriais

O laboratório da UMA participa nas distribuições do Drinking Water Scheme do EQA (external quality assessment), promovidos pela Public Health England, na realização de ensaios interlaboratoriais.

Os resultados apresentados na tabela 15, são referentes a avaliação de desempenho do laboratório, durante a sua participação em ensaios interlaboratoriais, no período de fevereiro de 2014 e junho de 2016 para a contagem e deteção de *Clostridium perfringens*.

Tabela 15: Avaliação de desempenho do laboratório nos EIL – *Clostridium perfringens*

Avaliação do desempenho – Ensaios interlaboratoriais						
Parâmetros			Nº de ensaios	Falsos		Pontuação
				(+)	(-)	
Contagem e deteção de <i>Clostridium perfringens</i>	IT-31 Ed.4		18	0	0	100%
Contagem e deteção de <i>Clostridium perfringens</i>	ISO 14189:2013		3	0	0	100%

Fonte: adaptado do relatório de implementação da UMA

Na tabela 16, ilustrada a seguir, são apresentados os resultados da avaliação de desempenho do laboratório nos primeiros ensaios interlaboratoriais, para a

contagem de coliformes e *E. coli* em águas de consumo humano, que decorreram em fevereiro e junho de 2016.

Tabela 16: Avaliação de desempenho nos EIL – coliformes e *E.coli*

Avaliação do desempenho – Ensaio interlaboratoriais					
Parâmetros		Nº de ensaios	Falsos		Pontuação
			(+)	(-)	
Contagem e deteção de coliformes totais	ISO 9308-1:2014	6	0	0	100%
Contagem e deteção de <i>Escherichia coli</i>	ISO 9308-1:2014	6	0	0	100%

Fonte: adaptado do relatório de implementação da UMA

3.5. Participação em atividades de desenvolvimento do laboratório

O envolvimento da UMA em trabalhos de projetos com entidades e empresas para além do processamento de amostras no âmbito do controlo de qualidade, é comum e normal fazendo parte das suas atribuições. Precisamente neste âmbito foi estabelecida uma colaboração com uma unidade industrial do sector alimentar, sediada no Norte, que se dedica à transformação e comercialização de bacalhau, e outros produtos de pesca.

O bacalhau comercializado pela empresa pertence à espécie *Gadus morhua* e é pescado no Atlântico Nordeste, tendo como os principais países de origem a Noruega, a Islândia e a Rússia. Trabalha ainda com o bacalhau do Oceano Pacífico, o *Gadus macrocephalus*, pescado na zona do Alasca. O processo de produção do bacalhau é baseado na secular tradição de cura (salga do bacalhau), considerado um dos mais tradicionais métodos de preservação de alimentos. Neste processo, o princípio dominante é a penetração do sal e a saída de água, originando a perda de peso ao produto e uma alteração da atividade de água associada ao produto.

Após a chegada do bacalhau às suas instalações, todo o processo que envolve o seu processamento (escala, salga, secagem, demolha, vidragem e congelamento) demora, no mínimo, dois meses e, dependendo do tipo do bacalhau, pode ser mais longo.

3.5.1. Objetivos do trabalho

O produto analisado foi o bacalhau pertencente à espécie *Gadus morhua* (proveniente da Noruega) e a respetiva água da demolha. O bacalhau foi analisado antes e depois da demolha, por forma a estudar se a demolha, a qualidade da sua água e o tempo exercem algum tipo de influência na qualidade microbiológica do bacalhau.

Foram também efetuados esfregaços de superfície aos tanques (hidratadores) e cestos de demolha, onde o bacalhau esteve durante o processo da demolha, para verificação da eficácia dos procedimentos de higienização.

3.5.2. Análises microbiológicas realizadas

A manipulação das amostras foi realizada de forma a minimizar qualquer risco de contaminação.

Os parâmetros de análises realizados, foram estabelecidos de acordo com o tipo de produto, considerando os microrganismos capazes de se desenvolver nas condições em que o produto é exposto.

Neste sentido, as análises realizadas ao bacalhau, à água da demolha e aos esfregaços de superfície, tiveram em consideração os parâmetros apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Análises microbiológicas realizadas

Parâmetro	Método	Referência
Contagem de Microrganismos a 30°C	Incorporação	ISO 4833-1:2013
Contagem de Microrganismos a 6,5°C	Incorporação	ISO 17410:2001
Contagem de Enterobacteriaceae	Incorporação	ISO 21528-2:2004
Contagem de <i>Escherichia coli</i>	Incorporação	ISO 16649-2:2001
Contagem de Estafilococos coagulase positiva	Incorporação	ISO 6888-2: 1999/Amd.1:2003

Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	Espalhamento a superfície	ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	-	ISO 6579:2002
Pesquisa de Esporos de Clostrídios Sulfito-redutores	Incorporação	NP 2262:1986
Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp.	-	ISO/TS 21872-1:2007
Pesquisa de bactérias halófilas	-	Yeannes <i>et al</i> (2011) & Baross (2001)
Contagem de Microrganismos a 30°C	Incorporação	ISO 4833-1:2013
Contagem de Enterobacteriaceae	Incorporação	ISO 21528-2:2004
Contagem de <i>Escherichia coli</i>	Incorporação	ISO 16649-2:2001

3.5.3. Métodos

Os métodos e meios de cultura utilizados durante as análises são os descritos nas normas e/referências indicadas para cada parâmetro realizado. Sempre que possível e adequado foram realizados controlos de esterilidade, controlos positivos e negativos de cada meio de cultura.

Na tabela 18 apresentada a seguir, é feita a correspondência entre o meio de cultura e os microrganismos usados nos respetivos controlos.

Tabela 18: Correspondência entre os meios de cultura e os microrganismos de referência usados

Meio de cultura	Microrganismo de referência (ISO 11133:2014)		
	Produtividade	Especificidade	Seletividade
PCA	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012) / <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (WDCM 00003)	—	—
VRBG	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012) / <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	—	<i>Enterococos faecalis</i> ATCC 19433 (WDCM 00009)
TBX	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM00012)	<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 6272 (WDCM 00077)	<i>Enterococos faecalis</i> ATCC 19433 (WDCM 0009)

BPA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (WDCM 00034)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305 (WDCM 00159)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012)
ALOA	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b ATCC 13932 (WDCM 00021)	<i>Listeria innocua</i> CECT 910 (WDCM 00017)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012)
XLD	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (WDCM 00009)
SMID2	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	–	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (WDCM 00009)
TSCE	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 (WDCM 00007)	–	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (WDCM 00003)
TSI	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	–	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012)
MRVP	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (00175)	–	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)
TB	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012)	–	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)
LDB	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	–	<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 6272 (WDCM 00077)
UA	<i>Proteus mirabilis</i> (isolada de estirpe selvagem)	–	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)
SCA	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	–	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012)
MKTTn	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	–	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (WDCM 00009)
RVS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030)	–	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (WDCM 00009)

3.5.4.1. Contagem de microrganismos a 30°C

O procedimento usado para a contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos foi baseado na norma ISO 4833-1:2013.

De acordo com esta norma, foi incorporado em placa de Petri 1 ml de cada diluição decimal em meio de cultura Plate Count Agar (PCA) e, após solidificação, colocado a incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $72 \pm 3\text{h}$ (horas).

Os resultados foram expressos em ufc/g de bacalhau, ufc/ml de água de demolha ou ufc/cm² de esfregaço de superfície analisada.

O limite de deteção para este método é de <1 ufc/ml para amostra de água, <10 ufc/g para amostras de alimento e <1 ufc/cm² para esfregaços de superfícies.

3.5.4.2. Contagem de microrganismos a 6.5°C

A contagem de microrganismos psicrotróficos, foi realizada, através da técnica de incorporação em placa de Petri de 1ml de cada diluição decimal em meio de cultura PCA (Merck, Alemanha), e incubado à temperatura de 6.5 ± 1°C durante 10 dias, conforme indica a norma ISO 17410:2001.

Os resultados foram expressos em ufc/g de bacalhau ou ufc/ml de água de demolha.

O limite de deteção para este método é de <1 ufc/ml para amostra de água e <10 ufc/g para amostras de alimento.

3.5.4.3. Contagem de Enterobacteriaceae

O procedimento usado para a contagem das Enterobacteriaceae está descrito na norma ISO 21528-2:2004. De acordo com esta norma, o método de contagem é por incorporação em placa de Petri de 1 ml de cada diluição decimal em meio VRBG (Biokar, França). As placas de Petri foram incubadas à temperatura de 37 ± 1°C durante 24h.

Ainda de acordo com a respetiva norma, o procedimento para a realização desta análise, pressupõe a confirmação das colónias típicas de Enterobacteriaceae.

Os resultados foram expressos em ufc/g de bacalhau, ufc/ml de água de demolha ou ufc/cm² de esfregaço de superfície analisada.

O limite de deteção para este método é de <1 ufc/ml para amostra de água, <10 ufc/g para amostras de alimento e <1 ufc/cm² para esfregaços de superfícies.

3.5.4.4. Contagem de *Escherichia coli*

O procedimento usado para a contagem de *E. coli*, foi baseado na norma ISO 16649-2:2001. De acordo com a esta norma, o método de contagem é por incorporação em placa de Petri de 1 ml de cada diluição decimal em meio de cultura TBX (Biokar, França). As placas foram incubadas à temperatura de $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $21 \pm 3\text{h}$.

Os resultados foram expressos em ufc/g de bacalhau, ufc/ml de água de demolha ou ufc/ cm^2 de esfregaço de superfície analisada.

O limite de detecção para este método é de <1 ufc/ml para amostra de água, <10 ufc/g para amostras de alimento e <1 ufc/ cm^2 para esfregaços de superfícies.

3.5.4.5. Contagem de *Estafilococos coagulase positiva*

O procedimento usado para a contagem de estafilococos coagulase positiva está descrito na norma ISO 6888-2:1999 / Amd1:2003. De acordo com esta norma, o método de contagem é por incorporação em placa de Petri de 1 ml de cada diluição decimal em meio de cultura BPA (Scharlau, Espanha), com a adição do suplemento RPF (Rabbit plasma fibrinogen) (Biokar, França). As placas foram incubadas à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $21 \pm 3\text{h}$.

Os resultados foram expressos em ufc/g de bacalhau ou ufc/ml de água de demolha.

O limite de detecção para este método é de <1 ufc/ml para amostra de água e <10 ufc/g para amostras de alimento.

3.5.4.6. Contagem de *Listeria monocytogenes*

O procedimento usado para a contagem de *Listeria monocytogenes* está descrito na norma ISO 11290-2:1998 / Amd1:2004. O método de contagem foi por espalhamento à superfície de 1 ml e 0,1 ml da suspensão inicial em placas de Petri (120 mm e 90 mm, respetivamente) contendo o meio ALOA (Oxoid, Inglaterra). As placas foram incubadas à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $48 \pm$

3h. De acordo com a respetiva norma, o procedimento pressupõe a confirmação de *Listeria monocytogenes*, através de métodos bioquímicos e culturais, para casos em que há crescimento de colónias típicas, após a incubação.

Os resultados foram expressos em ufc/g de bacalhau ou ufc/ml de água de demolha.

O limite de deteção para este método é de <1 ufc/ml para amostra de água e <10 ufc/g para amostras de alimento.

3.5.4.7. Pesquisa de *Salmonella* spp.

O procedimento usado para a deteção de *Salmonella* spp., está descrito na norma ISO 6579:2002. Quanto aos meios de cultura, a deteção de *Salmonella* pressupõe um pré-enriquecimento da amostra em APT (Merck, Alemanha) com a temperatura de incubação de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 a 20h, seguida de uma repicagem para meios de MKTTn (Biokar, França) e RVS (Biokar, França) que são incubados durante $18 \pm 2\text{h}$, à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$, respetivamente.

Após o segundo enriquecimento, procede-se a inoculação em meios sólidos de SMID2 (Biomérieux, França) e XLD (Oxoid, Inglaterra), que são incubadas à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \pm 3\text{h}$. De acordo com a respetiva norma, o procedimento para a realização desta análise, pressupõe a confirmação bioquímica e serológica da *Salmonella*, para casos em que apresentar o crescimento de colónias típicas após a incubação.

Os resultados foram expressos em presente ou ausente em 25 g / 25 ml de bacalhau ou água de demolha, respetivamente.

3.5.4.8. Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores

A pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores, foi realizada de acordo o procedimento descrito na NP 2262:1986. O meio de cultura usado para esta análise, é o TSCE (Biokar, França) em concentração dupla. A incubação é realizada à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 1 a 5 dias, em condições

de anaerobiose. Considera-se resultado positivo as placas que apresentam o crescimento de colónias negras características. Neste procedimento, os esporos foram inativados no aquecimento a $80 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 10min.

Os resultados foram expressos em presente ou ausente em 10 g / 10 ml de bacalhau ou água de demolha, respetivamente.

3.5.4.9. Pesquisa e identificação de *Vibrio* spp.

3.5.4.9.1. Pesquisa de *Vibrio* spp.

A pesquisa de *Vibrio* spp., foi realizada de acordo com o procedimento descrito na norma ISO/TS 21872-1:2007. O meio de cultura usado para esta análise foi o ChromAgar *Vibrio* (Chromagar, França). Antes da sementeira em placas, a amostra passou por duas fases de enriquecimento (o primeiro durante $6 \pm 1\text{h}$, à temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e o segundo durante 24h à temperatura de $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ambos no meio de enriquecimento ASPW composto no laboratório). Após o enriquecimento, foi efetuada a sementeira em placas de Petri, incubadas à temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \pm 3\text{h}$.

Os resultados foram expressos em presente ou ausente em 10 g / 10 ml de bacalhau ou água de demolha respetivamente.

3.5.4.9.2. Identificação de *Vibrio* spp.

A identificação de *Vibrio* spp. presente no bacalhau, baseou-se no procedimento interno em uso no laboratório. A identificação foi realizada através da utilização de galerias bioquímicas (BBL Crystal, Irlanda). Antes do uso das galerias, inoculou-se a cultura de *Vibrio* presente na pesquisa, para o meio de crescimento ASPW, e incubou-se à temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ até obter-se um crescimento abundante.

3.5.4.10. Pesquisa e identificação de bactérias halófilas

3.5.4.10.1. Pesquisa de bactérias halófilas

A pesquisa de bactérias halófilas, foi realizada de acordo com o método de SAMm (SAM modificado) proposto por Yeannes *et al* (2011) e pelo método descrito por Baross (2001). De acordo com as respectivas referências, os meios usados para as análises foram o HB (meio de enriquecimento e / diluente, composto no laboratório) e o HA (meio para o crescimento em placa que contém agar, composto no laboratório). A incubação foi efetuada à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante um período de 5 a 12 dias. Antes da sementeira em placas de Petri, a amostra passou por um processo de enriquecimento em meio HB, incubado à temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 12 dias.

Os resultados foram expressos em presente ou ausente em 10 g / 10 ml de bacalhau ou água de demolha, respetivamente.

3.5.4.10.2. Identificação de bactérias halófilas

Para a identificação presuntiva de bactérias halófilas, realizaram-se os testes de confirmação apresentados na seguinte tabela 19.

Tabela 19: Testes necessários para a identificação de bactérias halófilas e resultados esperados

Testes	<i>Halococcus</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Natronobacterium</i> e <i>Natronococcus</i>
Oxidase	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
Catálase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Motilidade	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
Coloração gram	(-) (+)	(-)	(-)	(-)	(-) e (-)/(+) respetivamente
Morfologia	Cocos	Bacilos	Bacilos	Discos	Bacilos e cocos respetivamente
Esporos	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Aeróbios estritos	Sim	Não	Sim	-	-
Temperatura de crescimento	30-37 °C	30-55 °C	40-50 °C	30-55 °C	30-40 °C
Lise em água	Não	Não	Sim	Não	Não

Fonte: elaborado a partir de Oren *et al* (1997), Torreblanca *et al* (1986), Vreeland, (2002) e Hezayen (2002).

Antes da realização dos testes apresentados na tabela 18, fez-se a preparação preliminar da cultura a partir das colónias de bactérias halófilas detetadas nas amostras do bacalhau. A preparação preliminar da cultura, baseou-se no método proposto por Dussault (1995), onde se repicou 100µl da cultura para um tubo contendo 5 ml de meio HB. O tubo foi a incubar com agitação à temperatura de $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ao abrigo da luz.

A técnica de coloração Gram, baseou-se no método proposto por Dussault (1995). Este método, pressupõe que a técnica da coloração seja realizada apenas com o uso da solução de violeta de cristal (0,25%), antecedida da dessalinização com a solução de ácido acético (2%).

Para o teste de oxidase foram utilizadas as tiras de Bactident oxidase (Merck, Alemanha). O teste de catalase foi realizado em lâmina, com H_2O_2 a 3% (Sigma).

Para todos os isolados foi ainda verificada a motilidade e o crescimento em anaerobiose.

3.5.4. Tratamento de dados

Os valores “<y microrganismos/ml (g)” são valores incertos que não podem ser tratados estatisticamente sem modificações. No entanto, estes valores podem ser importantes quando a quantidade de dados é relativamente pequena. Nestes casos, uma vez que os dados são poucos a quantidade de valores “<y microrganismos/ml (g)” é significativa e a influência nos resultados estatísticos é elevada, não podendo ser desprezados.

De modo a uniformizar os cálculos, foi decidido que os resultados em que os valores correspondem a “<y microrganismos/ml (g)” tomam o valor “0”. Quando em cálculos estatísticos, e na mesma situação, adicionou-se uma unidade a cada um dos valores.

3.5.5. Resultados e discussão

Segundo Lacasse (1995), *Escherichia coli* é um bacilo gram negativo, anaeróbico facultativo, da família das Enterobacteriaceae. Esta bactéria, é comum na flora intestinal dos seres humanos e de vários animais. A maioria das estirpes é inofensiva e a sua procura na água ou nos alimentos serve simplesmente como indicador da contaminação fecal. Existem algumas estirpes patogénicas que podem provocar gastroenterites.

De acordo com Cristino (2000), o género *Staphylococcus* pertence à família dos Micrococcaceae, o nome tem origem grega e significa cocos em cacho, morfologia característica destes microrganismos, sobretudo quando cultivados à superfície de meios de cultura sólidos. Para Gava *et al* (2009), as bactérias do género *Staphylococcus*, são Gram positivas, anaeróbicos facultativas e não formadoras de esporos. Estas bactérias chegam aos alimentos, principalmente, devido a falha na higiene pessoal e durante a sua manipulação, e são capazes de multiplicar-se em alimentos contendo de 7,5% a 20% de cloreto de sódio.

A intoxicação estafilocócica é uma das principais causas de tox infeção alimentar de origem bacteriana em todo mundo. Uma das características desta doença é a rapidez de aparecimento das perturbações digestivas após a ingestão do alimento contaminado, sendo o período de incubação até ao aparecimento de sintomas geralmente de 2 a 6 horas.

Listeria monocytogenes é um bacilo gram positivo, não esporulado, anaeróbico facultativo e amplamente distribuído no ambiente. A *Listeria*, sobrevive muito tempo em teores elevados de sal, pHs ácidos e à desidratação. Pode crescer numa vasta gama de temperaturas e manifesta um certo crescimento em ambientes refrigerados (Lacasse, 1995).

A *Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, aeróbica ou anaeróbica facultativa, pertencente a família Enterobacteriaceae. Estes microrganismos, podem estar presentes em várias condições ambientais fora de hospedeiros, inclusive na presença de desidratação, sendo, no entanto incapazes de crescer em condições de dessecação.

Num total de 41 amostras analisadas em diferentes períodos, as análises de *E. coli*, estafilococos coagulase positiva e *L. monocytogenes*, apresentaram resultados inferiores ao limite de detecção do respetivo método e ausente em 25 g para *Salmonella*.

A contagem de Enterobacteriaceae apresentou resultados de $2,2 \times 10^4$ ufc/ml e 80 ufc/g em amostras de água de demolha e bacalhau demolhado, respetivamente, tendo as restantes 39 amostras apresentado resultados inferiores ao limite de detecção.

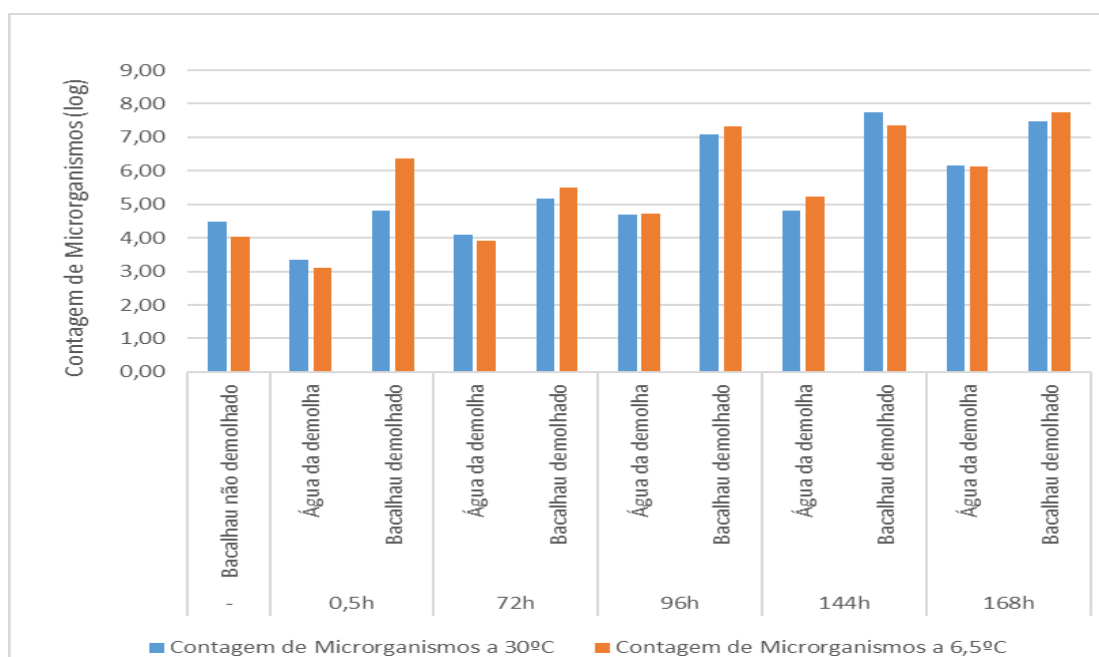
Quanto à pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores, esta foi dada como presente em apenas uma amostra de bacalhau demolhado. Segundo Ramos (2000), os clostrídios são um grupo heterogéneo, gram variável, com predomínio de formas bacilares longas e retas, podendo, no entanto, observar-se formas curvas, cocóides e até formas filamentosas. Os esporos podem ter uma localização central, terminal ou subterminal, sendo estes resistentes aos agentes físicos. Muitas espécies são saprófitas, vivendo no solo, e no intestino de muitos animais, incluindo o Homem, tornando-se em determinadas situações, patogénicas para este.

De acordo com Mendes (1998), o grupo de microrganismos designados por clostrídios anaeróbios, esporulados redutores de sulfito, possui um organismo de grande interesse como indicador de poluição de origem fecal, *Clostridium perfringens*. Este grupo de organismos é relativamente homogéneo, resistente à depuração natural e ao cloro. São indicadores de uma potencial poluição hídrica de origem fecal, remota ou intermitente, devido aos longos períodos de permanência e às condições de sobrevivência dos seus esporos.

Os resultados apresentados nas figuras abaixo, são referentes aos parâmetros nos quais se obtiveram contagens e / ou presenças de microrganismos nomeadamente: contagem de microrganismos a 30°C, contagem de microrganismos a 6,5°C, contagem de Enterobacteriaceae, pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores, pesquisa de *Vibrio* spp. e pesquisa de bactérias halófilas.

Os microrganismos a 30°C, incluem o grupo de microrganismos aeróbios mesófilos, capazes de se reproduzir à temperatura de 20°C a 45°C. Estes microrganismos, podem ser indicadores de qualidade do alimento nomeadamente em relação ao processo de produção ou de armazenamento. A existência de altas contagens pode ser indicador de procedimentos de higienização inadequados ao nível da produção (Franco & Langraf, 1996).

Figura 2: Valores médios das Contagens de Microrganismos a 30 e 6,5°C



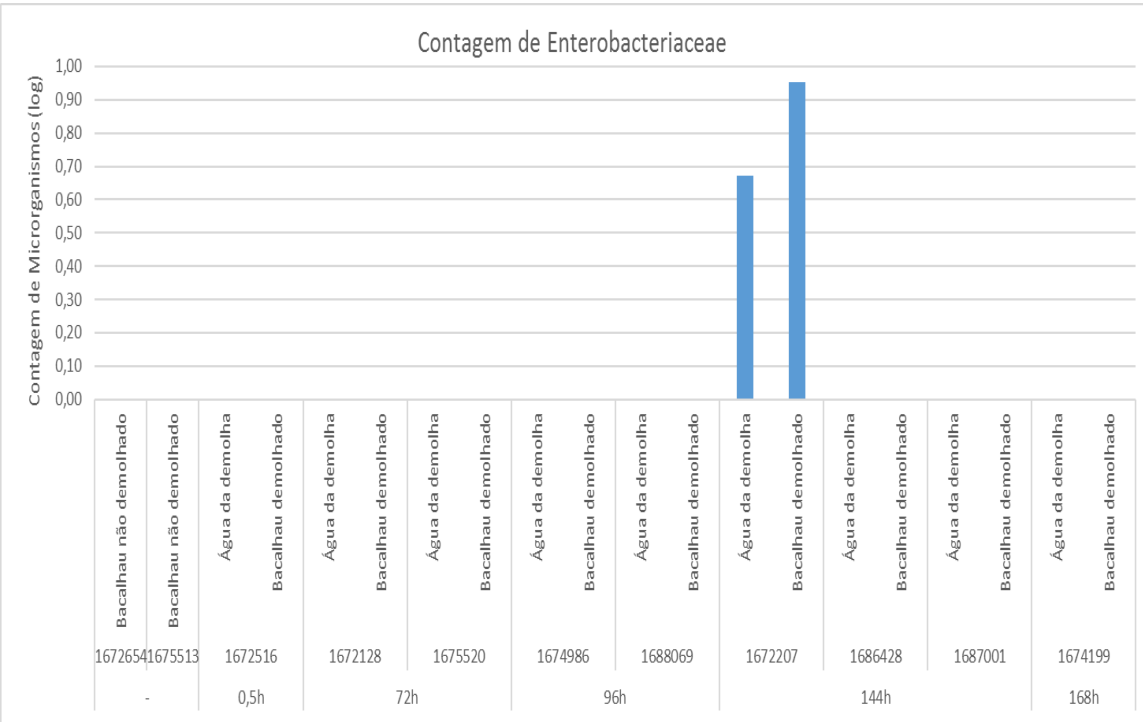
Na figura 2, são apresentados valores médios em log decimal das contagens de microrganismos a 30 e a 6,5°C da água de demolha, de bacalhau demolhado e de bacalhau não demolhado. Conforme indica a figura, todas as análises efetuadas apresentam contagens para os microrganismos totais a 30 e a 6,5°C. As amostras de bacalhau demolhado analisadas após 30min de demolha apresentam menor contagem, comparadas com as amostras analisadas após 168h de demolha.

As análises efetuadas ao bacalhau demolhado com tempo de demolha igual ou superior a 96h, apresentam maiores contagens de microrganismos a 30 e 6,5°C, tendo atingido valores próximos a 8,0 log. A observação desta figura leva-nos a concluir que, quanto maior o tempo da demolha do bacalhau, maior será a

contagem dos microrganismos totais. Apesar da temperatura baixa e controlada da água de demolha o desenvolvimento microbiano aparenta existir, podendo naturalmente influenciar a qualidade microbiológica do produto.

As bactérias psicrotróficas, capazes de se multiplicar à temperatura de 6.5°C fazem parte de um grupo amplo de bactérias encontradas em vários produtos alimentares como o leite, desenvolvendo-se em ambientes de refrigeração.

Tabela 20: Valores médios da Contagem de *Enterobacteriaceae*



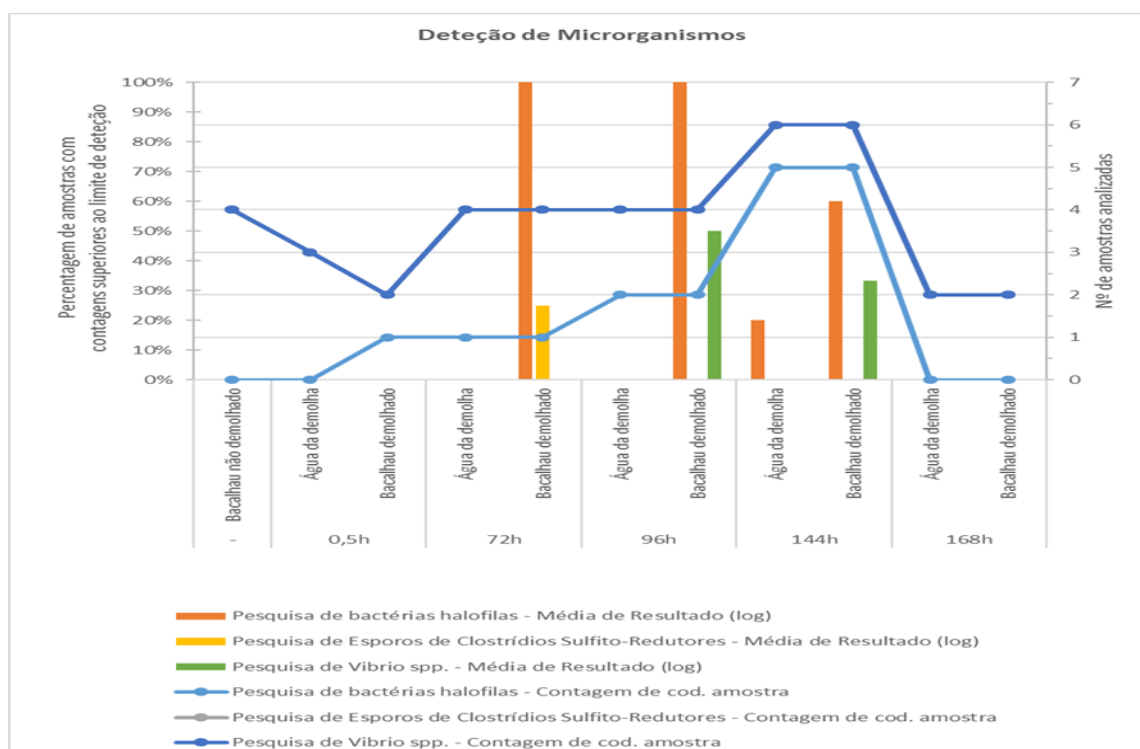
A tabela 20 apresenta valores médios da contagem de Enterobacteriaceae. Segundo Kornacki and Johnson (2001), as Enterobacteriaceae pertencem a uma família numerosa de bacilos retos, anaeróbicos facultativos, Gram negativos, fermentadores da glucose, geralmente produtores de catalase e redutores de nitrato. Os géneros mais comuns da família Enterobacteriaceae incluem: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebisella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*.

Num total de 41 amostras analisadas em tempos de demolha diferentes, a ocorrência de Enterobacteriaceae foi observada em duas amostras, água de demolha e bacalhau demolidado, ambas pertencentes ao mesmo processo com

o tempo de demolha de 144h. Na contagem de Enterobacteriaceae, os valores médios obtidos foram de 0,67 e 0,95 log para água de demolha e bacalhau de demolhado.

Observando a tabela 20, pode-se constatar que as restantes amostras analisadas apresentaram resultados inferiores ao limite de detecção. O facto desta contagem ter sido verificada em proporções relativamente menores, a contagem de Enterobacteriaceae nas amostras em causa, é relacionada a uma contaminação esporádica do processo, não podendo interferir-se uma ocorrência constante de Enterobacteriaceae nas amostras de bacalhau.

Gráfico 1: Valores percentuais da pesquisa de bactérias halófilas, esporos de clostrídios sulfito-redutores e *Vibrio* spp.



O gráfico 1 ilustra os resultados percentuais obtidos durante a pesquisa de bactérias halófilas, pesquisa de esporos de clostrídios sulfito redutores e pesquisa de *Vibrio* spp. Conforme indica o gráfico, a ocorrência de esporos de Clostrídios sulfito redutores, foi observada em apenas uma amostra de bacalhau demolhado com 72h de demolha, e à semelhança da contaminação por

Enterobacteriaceae, acredita-se que esta seja também um caso de contaminação esporádica no processo.

A pesquisa de *Vibrio* spp., foi positiva em quatro amostras de bacalhau demolhado.

Os *Vibrio* spp. são bacilos curvos aeróbios-anaeróbios facultativos, Gram negativos, oxidase positivos e moveis devido normalmente à presença de um único flagelo polar. Existem cerca de 35 espécies no género *Vibrio*, das quais doze são patogénicas para o homem: *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. carchariae*. Com a exceção de *V. cholerae*, todas as espécies são halófilas (Sousa & Taveira, 2000).

Os *Vibrio* são, normalmente o género bacteriano predominante nas águas estuarinas, e o seu número é mais elevado durante os meses quentes do ano (entre abril e outubro). Quase todas as infeções humanas por *Vibrio*, estão relacionadas com o consumo de marisco, peixe e moluscos (Sousa & Taveira, 2000). Para Lacasse (1995), as bactérias do género *Vibrio*, são responsáveis pela tox infeção alimentar de origem marinha causadora da vibriose. A doença vibriose, declara-se geralmente de 12 a 24h após a ingestão de um grande número de células vivas nos alimentos contaminados.

As bactérias de *Vibrio* spp. Isoladas, foram identificadas de acordo com o uso de galerias bioquímicas, sendo que os resultados obtidos indicam tratar-se de *Vibrio metschnikovii*.

Quanto às bactérias halófilas, recorrendo ao gráfico, pode se constatar que existem sete amostras contaminadas por bactérias halófilas, nomeadamente a água de demolha e o bacalhau demolhado. A ocorrência destes microrganismos é observada a 72h, 96h e 144h de demolha para bactérias halófilas e a 96h e 144h para o *Vibrio* spp.

São designadas bactérias halófilas aquelas capazes de crescer na presença de quantidades significativas de sal. A classificação destas bactérias, baseia-se na

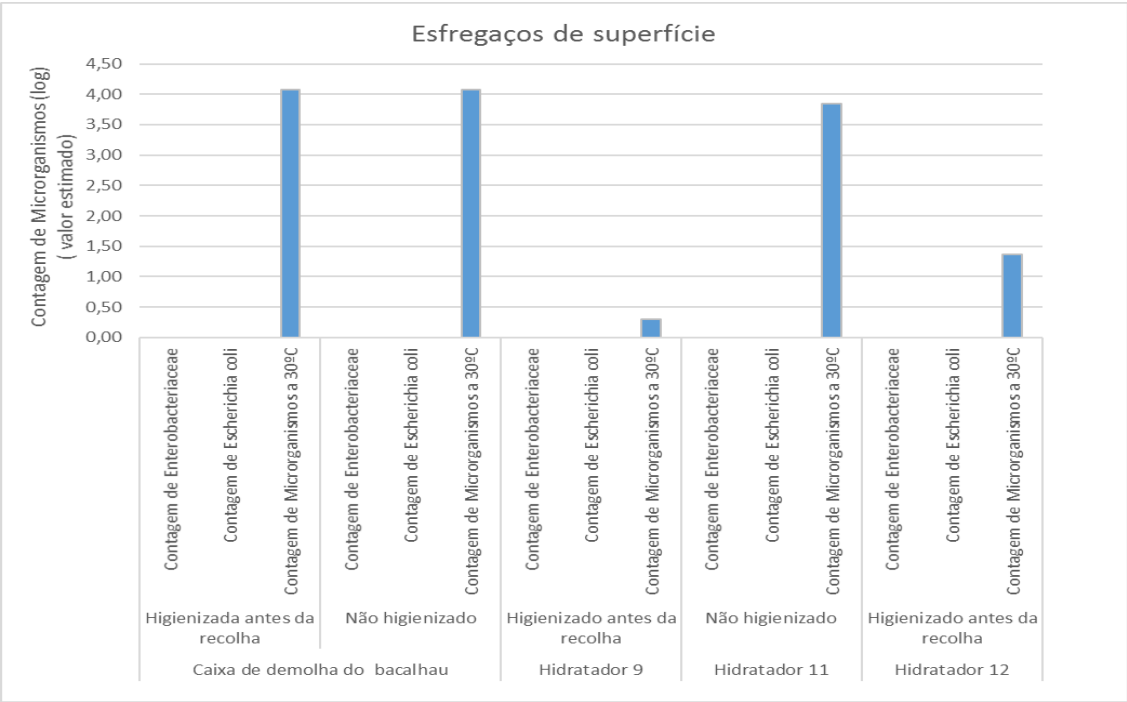
quantidade ou nível de NaCl necessário. As espécies de *Halococcus* e *Halobacterium* são alguns exemplos de bactérias extremamente halófilas, pois, desenvolvem-se em concentrações de NaCl de 13% a 30%. Os alimentos muito salgados podem por vezes ser contaminados por bactérias halófilas (Baross, 2001).

As bactérias halófilas isoladas, foram caracterizadas de acordo com os testes descritos na tabela 19, sendo que os resultados obtidos indicam tratar-se de *Halococcus* spp.

A seguir, apresentam-se na tabela 21 os resultados das análises realizadas aos esfregaços de superfície.

Uma vez que não existem muitas linhas orientadoras sobre os níveis aceitáveis de microrganismos em superfícies de processamento de alimentos, utilizaram-se como referência os critérios utilizados para superfícies em contato com alimentos prontos para consumo propostos por Little & Sagoo (2009) citados por Willis *et al* (2012), em particular, para o critério de superfícies higienizadas imediatamente antes da manipulação de alimentos.

Tabela 21: Valor estimado da análise dos esfregaços



Em todos os esfregaços analisados, os resultados de Enterobacteriaceae e *E. coli* foram inferiores ao limite de detecção. A contagem de microrganismos a 30°C ocorre em níveis elevados em caixas de demolha de bacalhau e tanques (hidratadores) de demolha não higienizados.

Como era expectável, existe um decréscimo nas contagens de microrganismos totais em tanques de demolha higienizados.

De acordo os resultados expostos na tabela 21, e utilizando a orientação proposta por Little & Sagoo (2009), citados por Willis *et al* (2012), o critério de interpretação é considerado insatisfatório quando temos contagens $\geq 10^3$ ufc/cm² e aceitável para casos em que a contagem é $< 10^3$ ufc/cm².

Quanto as caixas de demolha do bacalhau, na tabela 21, é possível observar que estas apresentam valores superiores quanto ao limite estimado da contagem de microrganismos totais a 30°C. As contagens elevadas de microrganismos totais a 30°C em caixas de demolha higienizadas, mostram a necessidade de ajustar os procedimentos de higienização ou alterar os agentes usados.

Visto que, o processo de higienização empregue nas caixas de demolha não demonstra a eficácia desejada, a probabilidade de ocorrência de contaminação cruzada é real, tendo em conta que todos os equipamentos e/ou materiais após o fim do ciclo do processo voltam novamente ao processo, para a realização de mais um ciclo de produção.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES

A realização deste estágio permitiu consolidar os conhecimentos obtidos na fase curricular do mestrado e adquirir novos conhecimentos e metodologias de trabalho em microbiologia alimentar. Através deste estágio, foi possível compreender a essência e o objetivo do controlo da qualidade em todas as etapas de realização das análises microbiológicas e a importância da ação do operador e da realização de um extenso, mas necessário procedimento de controlo da qualidade dessas mesmas análises.

Neste relatório, são descritas todas as atividades e competências adquiridas durante o estágio.

As análises microbiológicas efetuadas durante o estágio possibilitaram a minha qualificação técnica, e através desta, pude participar em análises com vista a implementação de novos métodos no laboratório, bem como participar num projeto de controlo da qualidade da água de demolha e do bacalhau demolido, em colaboração com uma entidade externa.

Todas as atividades desenvolvidas no laboratório foram desempenhadas, considerando sempre a importância do papel e da responsabilidade de cada função, na execução das diferentes tarefas, com vista à manutenção da qualidade dos resultados finais. O controlo da qualidade é evidenciado através do registo de todas as atividades desenvolvidas e os respetivos controlos.

O controlo microbiológico, representa uma das principais atividades desenvolvidas em qualquer sistema que tenha como objetivo a garantia da segurança alimentar. A sua realização, visa promover a saúde pública, na área de higiene e de segurança alimentar, através da identificação dos riscos e perigos capazes de estarem representados nos alimentos.

A realização do controlo microbiológico dos alimentos é indispensável na implementação, verificação e monitorização dos sistemas de gestão de segurança alimentar, indispensáveis para prevenir a ocorrência de toxinfecções

alimentares resultantes da presença de microrganismos patogénicos ou das suas toxinas.

A acreditação dos laboratórios de ensaio em particular relativamente a atividades que têm ligação direta com a saúde pública, como é o caso da microbiologia alimentar, é uma vantagem clara para todos os intervenientes no setor, desde os consumidores aos produtores, distribuidores e agentes de inspeção. A garantia da qualidade e fiabilidade dos resultados das análises que é oferecida, em conjunto com a sua independência, é fundamental nesta área tão importante para toda a população. A introdução dessa obrigatoriedade começa a surgir em termos legislativos para algumas atividades de controlo sendo desejável que se expanda ainda mais. Os rigorosos procedimentos de controlo da qualidade associadas aos laboratórios com análises acreditadas em conjunto com a existência de um sistema de gestão coerente e compatível com uma atividade laboratorial de excelência só pode ser benéfico para todo o sistema e para a confiança dos agentes económicos e muito em particular dos consumidores.

Por fim, face aos conhecimentos adquiridos no período de estágio e, olhando para os resultados apresentados no presente trabalho, consideram-se alcançados os objetivos inicialmente traçados para o estágio que o presente documento relata.

Referências bibliográficas

1. Armada, A., Machado, D., Junqueira, E., Couto, I., Ramos, J., Viveiros, M., Parreira, R., & Costa, S. (2014). *Manual de Segurança Biológica*. Lisboa: UNL.
2. Almeida, J. S., & Pires, A. C. (2006). *Acreditação: Vantagens e dificuldades da implementação de um Sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e /ou calibração*. Química, pág.34 - pág.39. Disponível em: <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/626/article/30001307/pdf>.
3. Baross, J. A., (2001). Halophilic and Osmophilic Microorganisms. In Downes, F.P., & Ito, K., (4^a ed), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pág. 187- pág.193). Washington: APHA.
4. Brumano, L. P., Ângelo, F. F., Amaral, L. H., Pinto, C. L. O., Almeida, J. A., & Pinto, M. A. O. (2011). *Estirpes bacterianas-padrão, formas de obtenção de doação e sua manutenção em laboratório de ensino e pesquisa*. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, volume (nº 3) pág.21-pág.26.
5. Cristino, J. M. (2000). Staphylococcus. In Ferreira, W., F., C., & Sousa, J. C. F. (Volume 2), *Microbiologia* (pág.39- pág.49). Lisboa: Lidel.
6. Decreto – Lei nº 306/2007 do Diário da Republica, 1^a série - nº 164 de 27 de agosto de 2007.
7. Dussault, H. P. (1995). *An Improved Technique for Staining Red Halophilic Bacteria*. Notes, volume nº 70, pág. 484 – pág. 485.
8. Fraqueza, M. J. (2002). *Métodos Rápidos Aplicados ao Controlo Microbiológico de Alimentos. Detecção e Gestão de Riscos em Alimentos*. Disponível em: <http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/edicao/congresso/40.pdf>.
9. Gava, A. J., Silva, C. A. B., & Frias, J. R. G. (2008). *Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Nobel.
10. Hezayen, F.F., et al (2002). *Characterization of a novel halophilic archaeon, Halobiforma haloterrestis gen. nov., sp. nov., and transfer of Natronobacterium nitratireducens to Halobiforma nitratireducens*

- comb.nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, volume 52, pag.2271-pag.2280. DOI 10.1099/ijs.0.02324-0.
11. ISO 3696 (1987). *Water for analytical laboratory use – Specification and test Methods*. Switzerland: ISSO.
 12. ISO 4833:1. (2013). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique*. Switzerland: ISO.
 13. ISO 6579. (2002). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal Methods for the detection of Salmonella spp.* Switzerland: ISO.
 14. ISO 6888-2. (2003) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*. Switzerland: ISO.
 15. ISO 9308-1 (2014). *Water quality – Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*. Switzerland: ISO.
 16. ISO 11290-2. (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration Of Listeria monocytogenes*. Switzerland: ISO.
 17. ISO 11133. (2014). *Microbiology of food, animal feed and Water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media*. Switzerland: ISO.
 18. ISO 14189 (2013). *Water Quality– Enumeration of Clostridium perfringens - Method using membrane filtration*. Switzerland: ISO.
 19. ISO 16649-2. (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal Methods for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli*. Switzerland: ISO.
 20. ISO 17410. (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Enumeration of psychrotrophic microorganisms*. Switzerland: ISO.
 21. ISO 21528-2. (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method*. Switzerland: ISO.

22. ISO/TS 21872-1. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp.* Switzerland: ISO.
23. ISO 29201 (2012). *Water quality -The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.* Switzerland: ISO.
24. Kornacki, J. L. & Johnson J. L. 2001). *Enterobacteriaceae*. In Downes, F.P., & Ito, K., (4^a ed), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pág. 96- pág.106). Washington: APHA.
25. Lacasse, D. (1995). *Introdução à Microbiologia Alimentar*. Lisboa: Instituto Piaget;
26. Lightfoot, N. F. & Maier, E.A. (1998). *Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance*. Amsterdam: Elsevier.
27. Mendes, B. (1998). Microbiologia da Água. In Ferreira, W., F., C., & Sousa, J. C. F. (Volume I), *Microbiologia* (pág.285- pág.296). Lisboa: Lidel;
28. NP 2262. (1986). *Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito- redutores*. Lisboa: IPQ.
29. NP EN 12740. (2002). *Biotecnologia - Laboratórios de Investigação, Desenvolvimento e Análises: Guia para o manuseamento, a inativação e o controlo de resíduos*. Caparica: IPQ.
30. NP EN 12741. (2000). *Biotecnologia - Laboratórios de Investigação, Desenvolvimento e Análises: Guia para operações em laboratórios de biotecnologia*. Caparica: IPQ.
31. NP EN ISO 19011 (2012). *Linhas de orientação para auditorias a sistemas de gestão* (ISO 19011: 2011). Caparica: IPQ.
32. NP EN ISO/IEC 17025 (2007). *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*. Caparica: IPQ.
33. Ramos, M. H. (2000). Bactérias Anaeróbias Gram positivas. In Ferreira, W., F., C., & Sousa, J. C. F. (Volume 2), *Microbiologia* (pág.248- pág.258). Lisboa: Lidel.
34. Ray, B. (1996). *Fundamental Food Microbiological*. Florida: CRC Press.

35. Regulamento (CE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de janeiro de 2002.
36. Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004. Jornal Oficial nº L 139 de 30/04/2004. Versão consolidada de 20 de abril de 2009.
37. Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004. Jornal Oficial nº L 139 de 30/04/2004. Versão consolidada de 1 de abril de 2016.
38. Regulamento (CE) nº 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004. Jornal Oficial nº L 165 de 30/04/2004. Versão consolidada de 28 de fevereiro de 2017.
39. Regulamento (CE) nº 2073/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de novembro de 2005. Jornal Oficial nº L 338 de 22/12/2005. Versão consolidada de 1 de janeiro de 2017.
40. Oren, A., Ventosa, A. & Grant, W. D., (1997). *Proposed minimal standards for description of new taxa in the order halobacteriales. International Journal of Systematic Bacteriology*, volume 47 (nº 01), pag.233-pag.238.
41. Organização Mundial da Saúde. (2004). *Manual de Segurança Biológica em Laboratório* (3ªed.). Genebra: OMS.
42. Sousa, J. C. F. & Taveira, N., C. (2000). Vibrionaceae. In Ferreira, W., F., C. & Sousa, J. C. F. (Volume 2), *Microbiologia* (pág.99- pág.109). Lisboa: Lidel.
43. Torreblanca, M., et al (1986). *Classification of non-alkaliphilic Halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of Haloarcula gen. nov and Haloferax gen. nov.* Systematic and Applied Microbiology, volume 8, pag.89-pag.99.
44. Vreeland, R.H., (2002). *Halosimplex carlsbadense gen. Nov., sp.nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined médium with glycerol and acetate or pyruvate.* Springer Verlag, volume 6, pag.445-pag.452. DOI 10.1007/s00792-002-0278-3.
45. Willis, C., Elviss, N., Aird, H., Fenelon, D., & McLauchlin, J. (2012). *LG Regulation /HPA Co-ordinated Food Liaison Group Studies: An Evaluation*

- of Hygiene Practices in Catering Premises at Large Scale Events in the United Kingdom with a Focus on Identifying Risks for the Olympics 2012.* London: Local Government Regulation and the Health Protection Agency.
46. Yeannes, M. I., Ameztoy, I. M., Ramirez, E. E., & Felix, M. M. (2011). *Culture Alternative Medium for the Growth of Extreme Halophilic Bacteria in Fish Products.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, pág.561- pág.566. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v31n3/a02v31n3.pdf>.